



Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain

Sophie Fougeray

► To cite this version:

Sophie Fougeray. Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P618 . tel-00829103

HAL Id: tel-00829103

<https://theses.hal.science/tel-00829103>

Submitted on 2 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Ecole doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Pharmacologie et biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mademoiselle Sophie Fougeray

Le 10 octobre 2012

**Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie
dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par
des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain**

JURY

Mme le Docteur Sophie Brouard	Rapporteur
Mr le Docteur Mathias Faure	Rapporteur
Mme le Professeur Marie-Noëlle Péraldi	Examinateur
Mr le Docteur Pierre-Louis Tharaux	Examinateur
Mr le Docteur Nicolas Pallet	Co-directeur de thèse
Mr le Professeur Eric Thervet	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les Docteurs Sophie Brouard et Mathias Faure de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et de vos suggestions qui ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Marie-Noëlle Péraldi d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je tiens également à te remercier de m'avoir sollicitée pour collaborer à ton projet.

Je remercie le Docteur Pierre-Louis Tharaux d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Je remercie le Professeur Eric Thervet d'avoir accepté de diriger ces recherches et d'avoir pu me permettre de présenter régulièrement mes résultats dans divers congrès.

Je remercie le Docteur Nicolas Pallet d'avoir co-dirigé cette thèse avec autant d'implication et de disponibilité malgré la distance. Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée pendant plus de trois ans. Ta réflexion scientifique, tes conseils avisés et ton efficacité m'ont, sans conteste, permis de réaliser ces travaux. Ton optimisme permanent m'a aidé à ne jamais baisser les bras même quand tout ne fonctionnait pas comme nous le souhaitions.

Je remercie le Professeur Pierre Laurent-Puig de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'unité 775 de m'avoir accueillie chaleureusement, de leur grande disponibilité, de leur écoute et de leur gentillesse. Je remercie plus particulièrement Karine, Fabien et Monique qui m'ont beaucoup aidé dans la réalisation de mes premières manipes. Merci à Jean-Pierre, toujours serviable pour les commandes ! Je remercie également Caroline pour ces conseils d'organisation, ô combien utiles pour faciliter la vie d'un doctorant !

Je remercie l'équipe « néphro » avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler et à partager le bureau. Merci Dany, Lucile, Raja, Clémentine, Iadh et Mélanie pour votre bonne humeur quotidienne et pour la bonne ambiance que vous avez créée dans le bureau. Je remercie plus spécialement Nicolas B. qui m'a accompagné pendant ces trois ans. Merci pour tous les services que tu m'as rendus ! Merci pour ta bonne humeur constante et ton sens de l'humour qui ont rendu mes journées au labo très agréables ! Je te souhaite bon courage pour la fin de la thèse, bonne chance pour la suite et surtout beaucoup de bonheur dans ta vie personnelle et professionnelle.

Je remercie également Jeannig avec qui j'ai été ravie de travailler au cours de cette dernière année. Ces journées à Saint-Louis m'ont permis de me sortir la tête du rein et de me changer les idées !

Je remercie les membres du laboratoire de galénique de la faculté de pharmacie de Paris Descartes qui m'ont guidée dans mes premiers pas d'enseignante. Je remercie particulièrement Françoise qui a toujours pris le temps de répondre à mes interrogations.

Je tiens à remercier tout mon entourage d'avoir été présent pendant trois ans. Tout d'abord, merci aux parisiennes-mayennaises pour tous ces bons moments passés en votre compagnie : Audrey pour tes visites parisiennes très régulières, Violette pour ces footings quasi hebdomadaires, Caro, Lili, Lulu D, Marie, Marion, Nath pour ces après-midi, ces dîners, ces soirées toutes ensemble où nous ne nous arrêtons jamais de « philosopher » et de rire. Merci à toutes les dionysiennes que je vois moins souvent mais que je retrouve toujours avec plaisir quand je rentre à Saint-Denis.

Je remercie également les belles rencontres parisiennes. Merci Titane, Lucie, Marco, Guigui, Auré, Stephen pour les bonnes bouffes, les bonnes soirées et les bons week-ends qu'on a pu passer ensemble ! Merci Benji et Caro de m'avoir initiée aux raids, une équipe de choc vient de se créer !

Je remercie les pharmaciens rennais, Aline, Anne, Boa, Clairon, Popo, Stef, d'être toujours prêts pour organiser un week-end, un nouvel an ou des vacances ensemble !

Je remercie la famille Lardeux pour leur accueil toujours chaleureux. C'est un vrai plaisir d'aller passer quelques jours à la campagne pour se ressourcer !

Je tiens à remercier mes parents qui me soutiennent depuis toujours. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir toujours accepté mes choix et de m'avoir encouragé dans ce que j'ai entrepris. Je remercie mes frères et sœurs, Sébastien, Anne et Baptiste que j'ai plaisir à retrouver à la maison, dans l'eau, sur un vélo ou dans des runnings. C'est toujours un grand bonheur de partager des moments (sportifs) en famille !

Enfin, je remercie Benoît d'être présent tout simplement. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, merci de m'avoir suivi dans mes projets et de continuer à le faire.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES	6
PREAMBULE.....	7
INTRODUCTION	8
Partie 1 : Le greffon rénal : cible de multiples agressions	9
I. Agressions du greffon rénal	9
A. Agressions ischémiques	11
1. Causes de l'ischémie	11
2. Ischémie-reperfusion (IR) et reprise retardée de fonction	12
3. Réponse à l'hypoxie : activation de HIF-1	13
B. Agressions immunologiques et importance de l'interféron γ	14
1. Des lésions tissulaires à l'alloimmunité	14
2. L'interféron γ (IFN γ) en transplantation rénale	15
II. Conséquences structurelles et fonctionnelles	17
A. Néphropathie chronique du transplant (NCT)	17
B. Processus biologiques impliqués dans la physiopathologie de la NCT	18
1. Inflammation	19
2. Transforming Growth Factor (TGF- β)	20
3. Stress oxydant	20
4. Apoptose	20
5. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	21
6. Angiogenèse	22
III. Mécanismes d'adaptation cellulaire aux stress	23

Partie 2 : Le stress du réticulum endoplasmique.....	25
I. Biologie du stress du réticulum endoplasmique (RE)	25
A. Le RE et le stress du RE	25
B. La réponse UPR (Unfolded Protein Response)	26
C. Stress du RE et apoptose	28
II. Le stress du RE en pathologie humaine.....	29
A. Stress du RE et diabète	29
B. Stress du RE et ischémie-reperfusion	30
C. Stress du RE et maladies neurodégénératives.....	32
D. Stress du RE et cancer	32
III. Le stress du RE au cours des néphropathies	34
A. Stress du RE et glomérulopathies	34
B. Stress du RE et lésions tubulaires	35
IV. Le stress du RE dans l'inflammation	36
V. Stress du RE et autophagie	37
Partie 3 : L'autophagie.....	39
I. Généralités sur l'autophagie	39
II. Biologie de l'autophagie	40
A. Initiation de l'autophagie	41
B. Elongation	42
C. Maturation et fusion	42
D. Dégradation lysosomale.....	43
E. Sélectivité de la dégradation lysosomale	43
III. Régulation de l'autophagie	44
A. La voie MTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin).....	45
B. Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2).....	46
C. La protéine Rubicon	46
D. L'AMPK (Adenosine Monophosphate-activated protein Kinase)	47
E. Les kinases eIF2 α	47
IV. L'autophagie : un processus de survie ou de mort cellulaire ?	48

V. L'autophagie en pathologie humaine.....	50
A. Autophagie et maladies neurodégénératives.....	50
B. Autophagie et cancer	51
C. Autophagie et pathologies rénales	52
VI. Autophagie, infections, immunité et inflammation	54
A. Autophagie et infections	54
B. Autophagie et immunité.....	55
C. Autophagie et inflammation.....	56
OBJECTIFS ET PRESENTATION DES TRAVAUX	58
Partie 1 : Objectifs de la thèse	59
Partie 2 : Travaux publiés.....	60
Article 1 : Le stress métabolique favorise l'inflammation tubulaire rénale en activant la réponse UPR (Unfolded Protein Response).....	60
Article 2 : La réponse UPR régule la réponse angiogénique dans l'épithélium rénal lors d'un stress ischémique.....	62
Article 3 : La déplétion en tryptophane et la kinase GCN2 sont impliquées dans l'activation de l'autophagie induite par l'interféron γ	63
Partie 3 : Travaux annexes	65
Etude 1 : Le stress du réticulum endoplasmique dans la maladie rénale associée à la mutation de UMOD : une étude de cas chez l'humain.....	65
Etude 2 : Dysfonction des cellules NK dans le diabète de type 2 : implication possible du stress du réticulum endoplasmique.....	67
Article 4 (revue) : Le stress du réticulum endoplasmique : un acteur méconnu dans la transplantation d'organes solides.	68
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81

Liste des abréviations

ANG : Angiogénine

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATF : Activating Transcription Factor

Atg : AuTophagy-related

ATP : Adenosine TriPhosphate

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

BiP : Binding immunoglobulin Protein

C/EBP β : Ccaat-enhancer binding protein β

CHOP : C/EBP HOmologous Protein

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CsA : Ciclosporine A

DAMPs : Damage/Danger-Associated Molecular Patterns

eIF2 α : eucaryotic Initiation Factor 2 α

EDEM : Endoplasmic Reticulum Degradation-enhancing α -mannosidase-like lectin

ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

GADD : Growth Arrest-DNA Damage inducible protein

GCN2 : General Control Nonderepressible 2

GFP : Green Fluorescent Protein

GRP : Glucose Regulated Protein

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1

IFN γ : Interféron γ

I κ B : Inhibitor κ B

IKK : I κ B Kinase

IL-1 β /6/8 : Interleukine-1 β /6/8

IR : Ischémie-Reperfusion

IRA : Insuffisance Rénale Aiguë

IRE1 : Inositol Requiring Enzyme 1

JNK : c-Jun N-terminal Kinase
LC3 ou **MAP-LC3** : Microtubule-Associated Protein Light Chain 3
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin
NCT : Néphropathie Chronique du Transplant
NF- κ B : Nuclear Factor- κ B
NK : Natural Killer
ORP150 : Oxygen-Regulated Protein 150 kDa
PDI : Protein Disulfide Isomerase
PERK : Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase
PKR : double-stranded RNA-binding Protein Kinase
RE : Réticulum Endoplasmique
RRF : Reprise Retardée de Fonction
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TLR : Toll-Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TRAF2/6 : TNF (Tumor Necrosis Factor) Receptor Associated Factor 2/6
ULK : UNC-51-Like Kinase
UPR : Unfolded Protein Response
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
XPB1 : X-box Binding Protein 1

Liste des figures et des tables

Figure 1 : Coupe longitudinale d'un rein et structure d'un néphron.

Figure 2 : Coupe d'une portion de glomérule.

Figure 3 : Physiopathologie de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.

Figure 4 : Facteurs favorisant les lésions chroniques d'allogreffe.

Figure 5 : Lésions élémentaires chroniques d'allogreffe.

Figure 6 : Réparation anormale dans l'insuffisance rénale aiguë ischémique.

Figure 7 : Représentation schématique de la réponse UPR (Unfolded Protein Response).

Figure 8 : Relations entre la réponse UPR et les voies de mort cellulaire.

Figure 9 : La réponse UPR et l'activation de NF- κ B.

Figure 10 : Les différents types d'autophagie.

Figure 11 : La machinerie autophagique et ses principaux acteurs.

Figure 12 : p62, un récepteur des protéines ubiquitinées.

Figure 13 : Protéines à domaine BH3 et interaction Beclin-1/Bcl-2.

Figure 14 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK.

Table 1 : Conséquences phénotypiques des souris mutées pour un gène de l'autophagie.

Préambule

Le rein greffé est un organe confronté en permanence à des agressions pouvant entraîner des altérations structurelles et fonctionnelles, qui, sur le long terme, contribueront au développement de lésions vasculaires, glomérulaires ou tubulo-interstitielles irréversibles pouvant conduire à une dysfonction complète de l'organe. L'insuffisance rénale chronique, une fois installée et lorsqu'elle devient terminale, oblige les patients à recourir à une méthode de suppléance, la dialyse, en attendant la transplantation d'un nouvel organe.

L'amélioration de l'efficacité des traitements immunosuppresseurs a permis de stabiliser la survie du greffon rénal à plus de 92% à un an et à environ 64% à 10 ans (Rapport annuel de l'Agence de la biomédecine, 2010). Cependant, la pénurie d'organes augmente régulièrement puisque le nombre de nouveaux patients en attente de greffe augmente d'année en année alors que le nombre de greffes réalisées depuis 2008 tend au mieux à se stabiliser voire à diminuer (Rapport annuel de l'Agence de la biomédecine, 2010). Il est donc essentiel de préserver au maximum la fonction rénale du greffon afin d'allonger sa survie.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des lésions structurelles du greffon rénal est donc essentielle. Cela permettrait de développer de nouveaux biomarqueurs de souffrance tissulaire et cellulaire plus sensibles et ainsi d'effectuer un dépistage précoce d'une situation pathologique, de rejet ou de néphrotoxicité par exemple, et de mettre en place un traitement plus adapté et plus efficace.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans cette nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes générant des réponses inflammatoire et angiogénique activées en réponse aux stress microenvironnementaux.

Introduction

Partie 1 : Le greffon rénal : cible de multiples agressions

Le rein est un organe vital complexe (**Figures 1 et 2**) qui exerce plusieurs fonctions majeures telles que l'élimination de déchets métaboliques et toxiques, le maintien de l'équilibre hydro-électrique et acido-basique et la régulation de la pression artérielle. Cependant, le parenchyme rénal, et en particulier le rein transplanté, est soumis à de multiples agressions toxiques, ischémiques ou immunologiques qui activent des réponses d'adaptation aux stress dans tous les types cellulaires. Si ces stress sont répétés ou trop intenses, ils pourront déclencher un programme de mort cellulaire comme l'apoptose. En plus de la régulation de la survie cellulaire, ces programmes adaptatifs sont impliqués dans le remodelage tissulaire et la fibrogenèse, ce qui peut conduire à des altérations structurelles et fonctionnelles irréversibles.

I. Agressions du greffon rénal

Au moment même d'être prélevé chez le donneur, le rein est soumis à de multiples agressions qui vont perdurer de manière plus ou moins intense et répétée tout au long de sa vie. Ces agresseurs, qui peuvent être d'origine immunologique (inflammation, activation du complément, cytotoxicité lymphocytaire et humorale), toxique (toxicité des inhibiteurs de la calcineurine en particulier), ischémique (ischémie froide, raréfaction capillaire, artériopathies) ou métabolique (hyperglycémie, dyslipidémie), sont responsables, à l'échelle cellulaire, de modifications microenvironnementales pouvant endommager les organites et les macromolécules intracellulaires, telles que les protéines, les lipides, l'ADN ou l'ARNm. Ces fluctuations du microenvironnement vont générer un stress cellulaire obligeant les cellules à activer des réponses adaptatives, comme l'élimination des macromolécules endommagées (Kroemer et al., 2010), l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation ou l'inhibition de la traduction protéique (Spriggs et al., 2010). Ces processus adaptatifs visent à préserver les fonctions cellulaires élémentaires et à assurer la survie des cellules. Cependant, si l'adaptation échoue, la mort cellulaire pourra survenir. Au-delà de la mort cellulaire programmée, ces mécanismes d'adaptation au stress cellulaire sont à

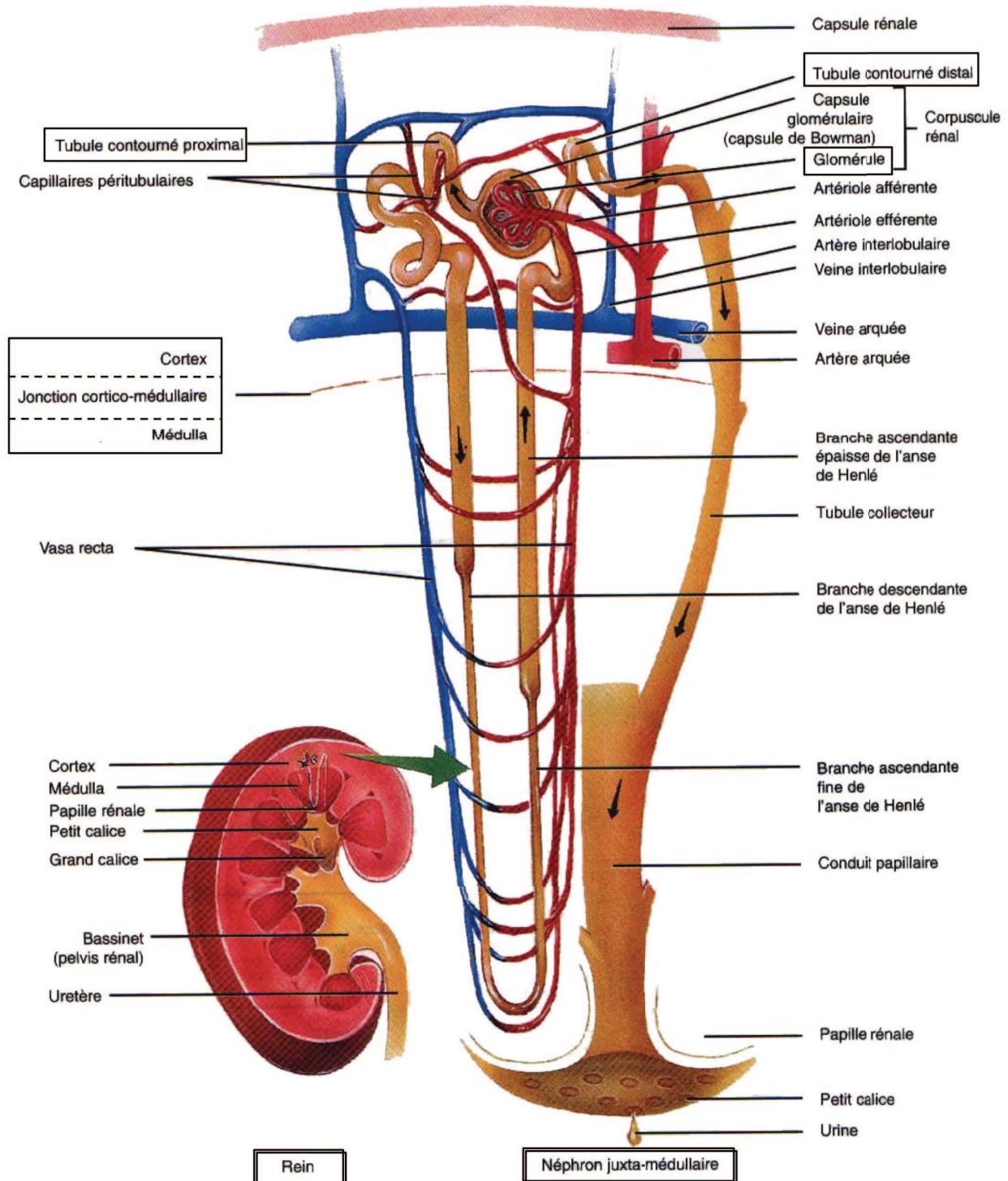


Figure 1 : Coupe longitudinale d'un rein et structure d'un néphron.

Le rein est un organe vital complexe composé d'environ 2 à 3 millions d'unités structurales et fonctionnelles, appelées néphrons, où se forme l'urine. Les néphrons sont constitués d'un corpuscule rénal, lui-même formé d'un glomérule et d'une capsule de Bowman, d'un tubule proximal, de l'anse de Henlé et d'un tubule distal qui rejoint le tube collecteur. Le glomérule permet de filtrer, de façon non sélective, le sang des capillaires glomérulaires et de former l'urine primitive. Celle-ci passe ensuite dans le système tubulaire où une grande partie de l'eau et des ions sont réabsorbés. La réabsorption est un processus sélectif qui a lieu au niveau du tubule proximal, de l'anse de Henlé et du tubule distal. L'urine définitive est obtenue après sécrétion dans l'urine des déchets métaboliques et des xénobiotiques encore présents dans le sang au niveau des tubules distaux et du tube collecteur. D'après le site : <http://bio.m2osw.com/gcartable/nephrologie.htm>

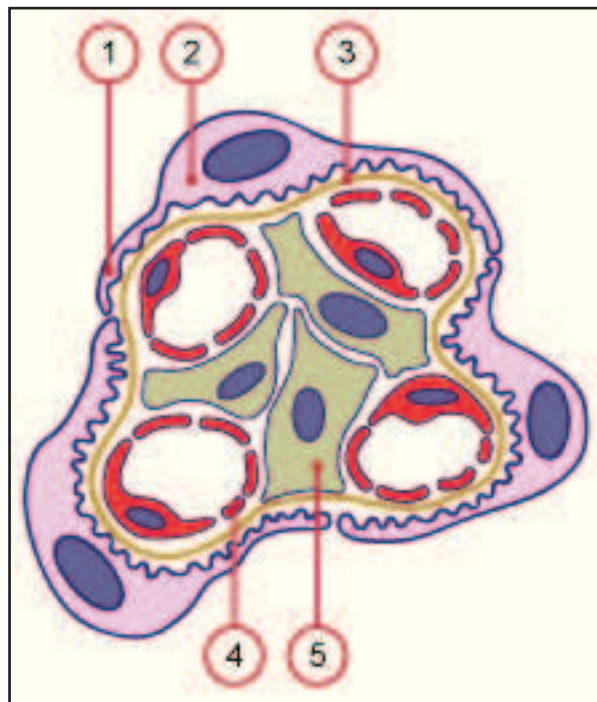


Figure 2 : Coupe d'une portion de glomérule.

Le glomérule, composant une partie du néphron, est constitué de podocytes (2) reposant sur une lame basale (3) et entourant les capillaires glomérulaires (4 : capillaire fenestré). Les podocytes présentent des prolongements primaires qui se divisent au contact des capillaires en de nombreux prolongements secondaires, appelés pédicelles (1). Les pédicelles s'interdigitent avec les prolongements primaires et secondaires d'autres podocytes formant ainsi une sorte de réseau complexe de petites fentes de filtration recouvertes par un mince diaphragme. Les podocytes sont des cellules épithéliales hautement spécialisées jouant un rôle essentiel dans le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. Elles assurent la filtration du plasma sanguin à travers leurs pédicelles. Ces derniers forment un réseau qui retient les hématies et les protéines afin d'empêcher leur excrétion dans l'urine. Des lésions des podocytes peuvent donc entraîner une protéinurie. Le réseau de capillaires repose sur un tissu interstitiel, appelé mésangium, composé de cellules mésangiales (5) et d'une matrice intercellulaire. Les cellules mésangiales sont des fibroblastes spécialisés ayant des propriétés contractiles et macrophagiques.

D'après le site : <http://www.unifr.ch/anatomy>

l'origine de réponses inflammatoire, angiogénique ou fibrogénique impliquées dans le remodelage tissulaire.

Ce travail de thèse porte sur le rôle de deux types de voies adaptatives aux stress, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et l'autophagie (voir *infra*), dans la régulation d'une réponse inflammatoire et angiogénique rénale, induites secondairement à des stress ischémiques et cytokiniques. Cette thématique de recherche portant sur l'implication du stress du réticulum endoplasmique (RE) et de l'autophagie en réponse à des stress liés à la transplantation rénale a émergé d'un projet d'étude portant sur la caractérisation des mécanismes de néphrotoxicité de la ciclosporine A (CsA), un immunosuppresseur de la famille des inhibiteurs de la calcineurine, qui entraîne une néphrotoxicité pouvant limiter son utilisation. En effet, la CsA est responsable d'une néphrotoxicité aiguë réversible liée à la dose administrée entraînant une insuffisance rénale, ainsi que d'une néphrotoxicité chronique contribuant au développement de la néphropathie chronique du transplant (NCT) (**Figure 3**). Des puces à ADN ont été utilisées afin de comparer le transcriptome de cellules tubulaires rénales traitées par la CsA ou par le sirolimus, un immunosuppresseur non néphrotoxique (Pallet et al., 2008c). L'analyse des profils d'expression génique nous a permis de mettre en évidence que la CsA induisait un stress du RE, ce qui constitue un mécanisme original de néphrotoxicité et une cible thérapeutique. Outre sa caractérisation *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu mettre en évidence que ce stress contribuait au développement de modifications phénotypiques épithéliales évocatrices de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Pallet et al., 2008a). Enfin, l'étude des conséquences du stress du RE sur les cellules tubulaires nous a également permis de caractériser un processus adaptatif original dans ce contexte de toxicité de la CsA, qui est l'autophagie (Pallet et al., 2008b).

Ces travaux ont soulevé la problématique du rôle du stress du RE dans la survenue de la néphrotoxicité de la CsA et par extension, dans le développement de la NCT. Nous avons donc considéré qu'appliqué à des problématiques spécifiques comme l'ischémie ou l'inflammation, ce champ d'investigation nouveau pourrait déboucher sur le développement de biomarqueurs de souffrance tissulaire ainsi que de nouvelles thérapeutiques néphroprotectrices.

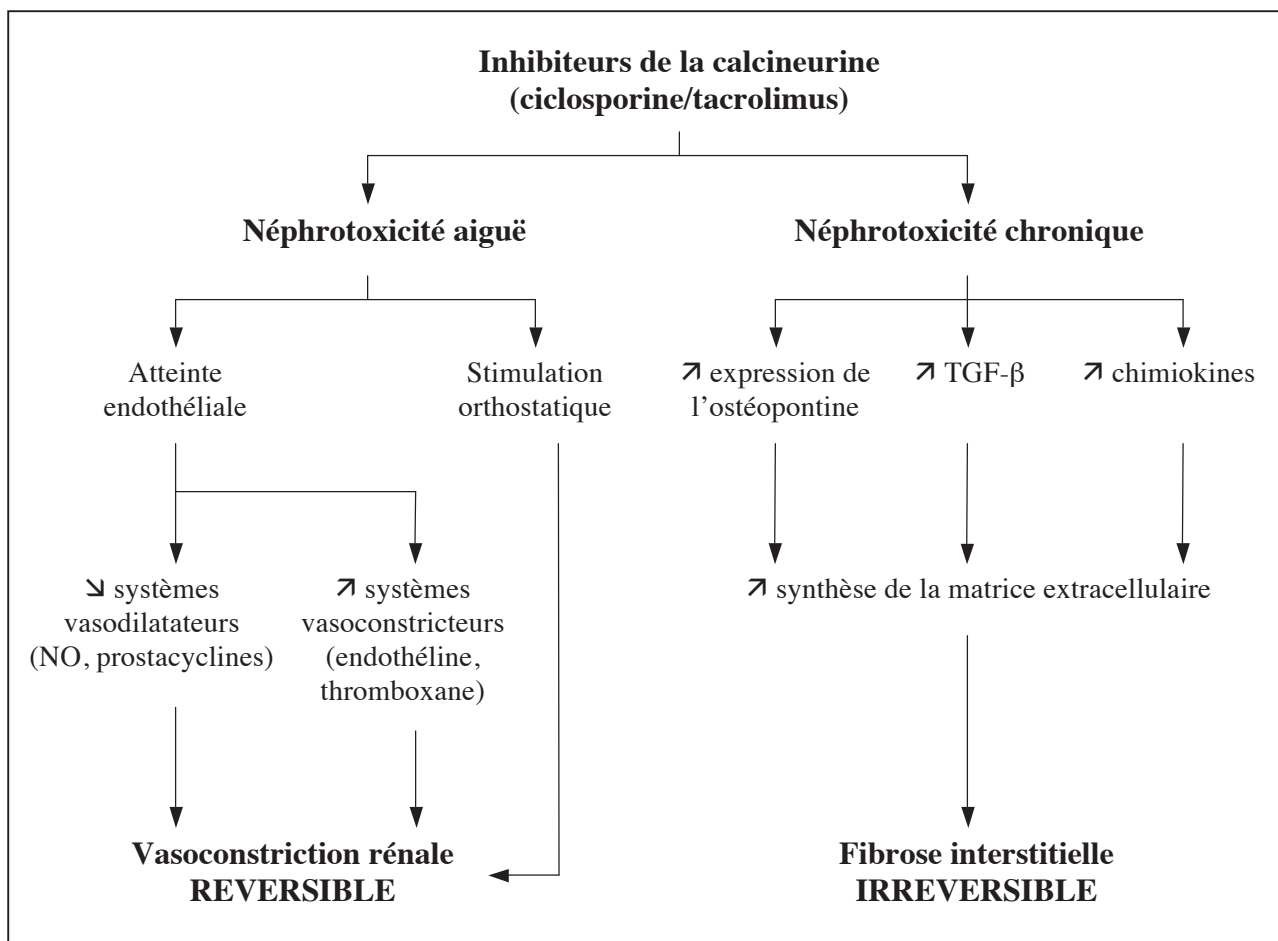


Figure 3 : Physiopathologie de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.
 NO : monoxyde d'azote ; TGF-β : Transforming Growth Factor-β.

D'après (Mourad et al., 2005).

A. Aggressions ischémiques

1. Causes de l'ischémie

Le rein greffé peut être soumis à des épisodes d'ischémie, c'est-à-dire à des apports sanguins réduits et insuffisants pour conserver l'homéostasie de l'organe, dont les causes sont variables. L'ischémie est caractérisée par un manque d'oxygène mais également par une carence en nutriments, et plus particulièrement en glucose et en acides aminés.

L'ischémie est observée au moment de la transplantation de l'organe. Le temps d'ischémie totale correspond à la durée entre le prélèvement et la reperfusion de l'organe pendant lequel ce dernier est privé de sang et donc d'oxygène et de nutriments. On distingue l'ischémie froide durant laquelle l'organe non approvisionné en sang est refroidi et l'ischémie chaude où l'organe reste à la température corporelle. Les conséquences de l'ischémie sur le greffon dépendent de la durée de celle-ci. Plus le temps d'ischémie est court, moins l'organe sera affecté. Au contraire, plus la durée de l'ischémie froide est prolongée et plus le greffon va être en souffrance et subir des dommages cellulaires et, par conséquent, la survie à long terme du greffon sera compromise.

Toutes les situations conduisant à une diminution du flux sanguin rénal peuvent causer une ischémie. Celle-ci peut être observée lors de l'utilisation de médicaments tels que les inhibiteurs de la calcineurine. En effet, ces molécules entraînent une vasoconstriction des artérioles glomérulaires afférentes et efférentes ce qui entraîne une diminution du flux sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire. Lors d'un stress oxydant, les radicaux superoxydes réduisent la biodisponibilité du monoxyde d'azote en formant le peroxydinitrite. La diminution de la production d'acide nitrique provoque une vasoconstriction et donc une diminution du flux sanguin (Mimura and Nangaku, 2010). De plus, la raréfaction des capillaires péri-tubulaires associée à des lésions tubulo-interstitielles étendues et à l'artériosclérose développée au cours du vieillissement peut également être responsable d'une hypoxie. Cette dernière peut réduire le nombre de capillaires péri-tubulaires et induire l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) aggravant ainsi l'hypoxie. En effet, la fibrose interstitielle peut amplifier l'hypoxie en augmentant l'espace séparant les capillaires et les cellules tubulaires. Elle réduit ainsi l'apport en oxygène même si la structure des capillaires péri-tubulaires est intacte (Mimura and Nangaku, 2010). Toute

lésion touchant les capillaires glomérulaires ou les capillaires péri-tubulaires peut donc entraîner une ischémie rénale.

2. Ischémie-reperfusion (IR) et reprise retardée de fonction

L'ischémie n'est pas la seule situation à engendrer des lésions du parenchyme rénal puisque la reperfusion qui lui fait suite peut, elle aussi, causer des lésions tissulaires contribuant au dysfonctionnement de la fonction rénale (Tilney and Guttman, 1997, Kosieradzki and Rowinski, 2008). Les lésions d'IR produites au sein du greffon rénal sont responsables d'un phénomène appelé « Reprise Retardée de Fonction » (RRF) dont les conséquences sont préjudiciables car la RRF nécessite des séances d'hémodialyse et prolonge la durée d'hospitalisation. Elle augmente également le risque de rejet aigu, diminue la survie à long terme du greffon et pourrait jouer un rôle dans la survenue de la NCT (Kuypers et al., 1999, Perico et al., 2004). La RRF est une forme d'insuffisance rénale aiguë (IRA) spécifique de la transplantation rénale. Le diagnostic de RRF est plus complexe que celui de l'IRA car il existe plusieurs définitions de la RRF fondées sur des critères cliniques qui diffèrent selon le centre de transplantation. La définition la plus communément admise est la nécessité de recourir à la dialyse dans la première semaine post-transplantation.

La RRF est secondaire à une nécrose tubulaire aiguë ischémique dont la physiopathologie s'articule autour des lésions d'IR inhérentes aux techniques de transplantation. Les lésions d'IR sont initiées par les modifications cellulaires liées à l'ischémie. L'hypoxie induite par l'ischémie oriente le métabolisme cellulaire vers les voies anaérobies à l'origine d'une baisse de la synthèse d'ATP qui va conduire à une augmentation du calcium intracellulaire puis une désorganisation du cytosquelette d'actine (Perico et al., 2004). De plus, l'ischémie peut entraîner une dissociation des jonctions serrées des cellules tubulaires, en particulier des cellules de la médulla externe plus sensibles à l'hypoxie, et une dépolarisation cellulaire. L'ischémie prolongée peut aussi être responsable de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Ces modifications structurales ont pour conséquence une altération fonctionnelle de l'homéostasie hydro-électrolytique et une diminution du débit de filtration glomérulaire (Szwarc et al., 2005).

La reperfusion du greffon entraîne un stress oxydant secondaire à une réoxygénation brutale du parenchyme rénal hypoxique et active une cascade de réactions vasculaires et

inflammatoires contribuant à la RRF du transplant. Lors de la reperfusion, le taux de monoxyde d'azote augmente pour contrecarrer l'effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 observé au cours de l'ischémie. A forte concentration, le monoxyde d'azote réagit avec les ions superoxydes pour former des espèces réactives de l'oxygène (ERO), les peroxynitrites (Chatterjee et al., 2003). La réponse inflammatoire, initiée au cours de l'ischémie et poursuivie lors de la reperfusion, impliquée dans la physiopathologie de la RRF, fait intervenir les cellules du receveur mais aussi les cellules du donneur. En effet, les macrophages de l'hôte migrent dans le rein greffé et stimulent la synthèse de chimiokines par les cellules dendritiques résidentes ce qui active les lymphocytes T et permet le recrutement des cellules de l'immunité adaptative (Dong et al., 2007). Les macrophages et les neutrophiles migrent au sein du greffon grâce à des molécules chimiotactiques, comme MCP-1 (Macrophage Chemotactic Protein-1), libérées par les cellules endothéliales. De plus, les cellules tubulaires proximales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), l'IL-6 (Interleukine-6) et l'IL-1 β , et augmentent l'expression de CXCR3 (C-X-C motif chemokine 3 Receptor) à la membrane basale afin de faciliter la pénétration des cellules inflammatoires à travers la paroi endothéliale (Siedlecki et al., 2011). Les cellules de la réponse immune innée contribuent à la production locale de radicaux libres via l'activité de la myéloperoxydase des neutrophiles et de la NADPH oxydase des macrophages. Ce stress oxydant va amplifier la réaction inflammatoire déjà mise en place.

3. Réponse à l'hypoxie : activation de HIF-1

Les cellules du parenchyme rénal, en réponse à l'ischémie, et plus particulièrement à l'hypoxie, vont activer un mécanisme leur permettant de s'adapter et de survivre. Le facteur HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) est un facteur de transcription clé de la régulation de cette réponse adaptative (Gunaratnam and Bonventre, 2009). HIF-1 est constitué d'une sous-unité α dépendante de l'oxygène présent dans le microenvironnement et d'une sous-unité β exprimée constitutivement. Très instable en normoxie, la sous-unité α est hydroxylée par des prolyl-hydroxylases puis se lie à la protéine von Hippel-Lindau. Cette dernière permet l'ubiquitination de la sous-unité α et sa dégradation par le protéasome. En situation d'hypoxie, la sous-unité α n'est plus hydroxylée et devient stable. HIF-1 α peut alors migrer dans le noyau et se dimériser avec HIF-1 β . Le complexe HIF-1

ainsi formé, en se fixant aux éléments de réponse à l'hypoxie, permettra la transcription de gènes de l'angiogenèse comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), de l'érythropoïèse, tel que l'érythropoïétine, et du métabolisme énergétique cellulaire. Cependant, l'activation de HIF-1 par l'hypoxie peut également induire la transcription de gènes profibrogéniques, tels que le Connective Tissue Growth Factor (CTGF), le Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP1) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Plasminogen Activator Inhibitor 1 [PAI-1]) favorisant ainsi la fibrose interstitielle (Kimura et al., 2008a).

B. Agressions immunologiques et importance de l'interféron

1. Des lésions tissulaires à l'alloimmunité

L'ischémie froide suivie de la reperfusion ou l'ischémie chaude sont responsables de lésions du parenchyme à l'origine d'une réponse inflammatoire, elle-même impliquée dans l'activation de l'immunité adaptative. D'après la « théorie du danger » proposée par Matzinger, les cellules nécrotiques ou en apoptose tardive libèrent des signaux de danger appelés DAMPs (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns) qui favorisent l'inflammation locale et amplifient les lésions initiales (Matzinger, 2002).

Les DAMPs sont des molécules endogènes qui peuvent être reconnues comme étant des signaux de danger lorsqu'ils sont libérés dans l'espace extracellulaire. Parmi eux, on retrouve la protéine HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. HMGB1 est un médiateur pro-inflammatoire et chimiotactique pouvant être générée secondairement à des lésions d'IR (Rosin and Okusa, 2011). Les protéines S100, impliquées dans l'inflammation et la fibrose associées à certaines maladies rénales, et les protéines chaperonnes HSPs (Heat-Shock Proteins) intervenant dans la synthèse des protéines, peuvent également jouer le rôle de DAMPs lorsqu'elles sont libérées dans l'espace extracellulaire (Rosin and Okusa, 2011).

Les DAMPs interviennent dans la génération de l'inflammation en se liant à différents types de récepteurs, comme les récepteurs Toll-like (Toll-like Receptor [TLR]) ou le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) présents à la surface de la membrane plasmique ou des endosomes des cellules immunes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T, cellules NK [Natural Killer]) et des cellules non

immunes (fibroblastes, cellules épithéliales respiratoires et urogénitales) (Essakalli et al., 2009). HMGB1, par exemple, en se fixant sur les TLR2, TLR4 ou les RAGE induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B) générant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Kawai and Akira, 2007). Il a été montré que les TLR2 et TLR4, dont l'expression est augmentée dans les cellules tubulaires rénales au cours des lésions d'IR, sont impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire et sont des médiateurs des dommages cellulaires induits par l'IR (Wu et al., 2007, Leemans et al., 2005).

L'inflammation créée secondairement aux lésions du parenchyme rénal et à l'activation des TLR participe à la formation d'un environnement hautement immunogène (Sellares et al., 2011, Mengel et al., 2011, Gago et al., 2012) favorisant la stimulation de l'alloimmunité. La réponse immune adaptative induite est caractérisée par l'activation des cellules présentatrices d'antigène, ainsi que l'activation et la prolifération des lymphocytes T du receveur et participe au rejet aigu et, à terme, à la perte du greffon.

2. L'interféron γ (IFN γ) en transplantation rénale

Dans cet environnement inflammatoire créé secondairement aux altérations du parenchyme rénal, l'IFN γ , une cytokine pro-inflammatoire, joue un rôle significatif. L'IFN γ et ses récepteurs (IFN γ Rs) sont impliqués dans la régulation de la réponse immune grâce à son activité antivirale, antibactérienne et anti-tumorale (George et al., 2012). L'activation des récepteurs de l'IFN γ stimule la voie des JAK2/STAT1 ce qui aboutit à la transcription de plusieurs centaines de gènes impliqués dans la régulation de la présentation antigénique, de la polarisation Th1 avec l'activation des macrophages, des cellules NK et de la cytotoxicité dépendante des cellules T, du trafic leucocytaire et des mécanismes de défenses antivirale et antibactérienne (Schroder et al., 2004).

En transplantation rénale, l'IFN γ est synthétisé dans diverses situations. Lors du rejet du transplant, il est produit en grande quantité par les cellules de l'immunité innée, les cellules NK et les macrophages, et les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T activés et les lymphocytes B (Schoenborn and Wilson, 2007). L'IFN γ est également sécrété lors d'infections notamment virales, et en particulier chez les transplantés rénaux lors d'une infection à BK virus. La primo-infection par le BK virus, un polyomavirus humain, se produit tôt pendant l'enfance et est le plus souvent asymptomatique. Les

principaux sites de latence sont l'épithélium rénal et l'urothélium (Abend et al., 2007). La réactivation du virus s'observe chez les greffés rénaux ayant reçus une immunosuppression importante, notamment par le tacrolimus et le mycophénolate mofétil, et peut entraîner une néphropathie tubulo-interstitielle (Beimler et al., 2007). Chez ces patients, le BK virus se réplique dans l'épithélium tubulaire, induit sa nécrose, génère une réaction inflammatoire massive et conduit rapidement à une fibrose extensive du greffon. L'IFN γ permet de lutter contre ce virus en inhibant l'expression et la réplication du génome du BK virus (Abend et al., 2007).

L'IFN γ est un régulateur majeur de l'homéostasie du greffon rénal. Il a des effets complexes et contradictoires sur les cellules immunes et non immunes, notamment sur les cellules rénales qui expriment constitutivement des IFN γ Rs à leur surface, et également sur la survie du greffon. L'IFN γ possède des propriétés immunorégulatrices fortement impliquées dans les processus de rejet d'allogreffe. Il peut induire l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et la présentation de l'antigène dans les cellules épithéliales et endothéliales (Goes et al., 1995), et peut également activer la réponse effectrice Th1. La déficience d'un récepteur à l'IFN γ dans le greffon de rein murin entraîne une diminution importante de l'expression des gènes du CMH (Haas et al., 1995). A l'inverse, l'IFN γ peut agir directement sur le greffon en jouant un rôle cytoprotecteur sur les cellules parenchymateuses rénales. Lors d'un rejet du greffon rénal déficient pour le récepteur à l'IFN γ chez la souris normale et lors d'un rejet du greffon normal chez la souris ne produisant pas d'IFN γ , il a été observé une nécrose massive des cellules épithéliales du transplant médiée par la réponse immune et associée à des lésions vasculaires se manifestant par une thrombose veineuse ainsi qu'une congestion des capillaires péri-tubulaires. Ces effets seraient réduits par l'administration d'IFN γ (Halloran et al., 2001a, Halloran et al., 2001b). L'IFN γ agirait donc lors de la phase précoce du rejet aigu et permettrait le maintien de la viabilité du greffon pendant l'inflammation en empêchant le développement de la thrombose, de la congestion des capillaires péri-tubulaires et de la nécrose. Le rôle protecteur de l'IFN γ vis-à-vis de la nécrose pourrait faire intervenir le facteur de transcription IRF-1 (IFN Regulatory Factor-1). La fonction des greffons déficients pour le facteur IRF-1 se détériore rapidement et une nécrose massive apparaît 5 jours après la greffe, suggérant que l'expression d'IRF-1 est essentielle à la résistance à la nécrose lors de la phase précoce du rejet aigu (Afrouzian et al., 2002). De plus, l'IFN γ pourrait inhiber la destruction de la microcirculation

responsable de la nécrose en inhibant la voie cytotoxique des perforines-granzymes (Sis et al., 2007).

L'IFN γ joue donc un rôle complexe dans la réponse immune et sur le greffon rénal. Son activité immunostimulante est bien décrite mais ses fonctions protectrices sur les tissus non immuns et en particulier sur le parenchyme rénal sont moins bien connues.

II. Conséquences structurelles et fonctionnelles

L'ensemble de ces agressions contribue à l'apparition de modifications structurelles et fonctionnelles des cellules du parenchyme rénal pouvant conduire à une IRA. Celle-ci est caractérisée par une perte rapide de la fonction rénale c'est-à-dire une diminution de la filtration glomérulaire. La pathogenèse de l'IRA est complexe et multifactorielle et fait intervenir des mécanismes microvasculaires et inflammatoires. L'IRA survient à la suite de lésions tubulaires générant des médiateurs de l'inflammation et des molécules vasoactives (Akca et al., 2009) et pouvant aller jusqu'à la mort des cellules. La vasoconstriction et l'inflammation tissulaire produites par ces médiateurs exacerbent les dommages tubulaires et contribuent à la fibrogenèse rénale. Les lésions qui en résultent deviennent alors irréversibles, ce qui a pour conséquence l'installation d'une insuffisance rénale chronique (Schrier et al., 2004).

Le greffon rénal fait également face à ces agressions aiguës et chroniques qui contribuent à l'apparition de la réponse alloimmune et l'inflammation, à la mort cellulaire, à la sénescence des cellules et à la fibrogenèse. D'un point de vue pathologique, ces différents stress sont impliqués dans le rejet aigu et chronique, le remodelage tissulaire, la fibrose interstitielle, l'atrophie tubulaire, la néphropathie chronique du transplant qui sont autant de facteurs impliqués dans la dysfonction et la perte du greffon (El-Zoghby et al., 2009, Nankivell et al., 2003).

A. Néphropathie chronique du transplant (NCT)

Après la première année de greffe, la NCT est la principale cause de perte du greffon après la mort du patient. La NCT résulte de l'action délétère de nombreux facteurs qui peuvent être associés au donneur, comme l'âge et les pathologies préexistantes, mais

également des facteurs liés à la chirurgie lors de la greffe, tels que l'ischémie-reperfusion, et enfin, des facteurs apparaissant après la greffe, à savoir, les rejets aigus, l'hypertension artérielle, le diabète, la protéinurie, les infections à BK virus et la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine. Ces facteurs, immunologiques et non immunologiques, contribuent conjointement à l'établissement progressif de lésions histologiques rénales irréversibles (**Figure 4**).

La NCT se définit sur le plan histologique. Les lésions qui la caractérisent, décrites il y a quelques années, ont permis de distinguer deux phases évolutives. Au cours de la première année apparaissent des lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle (**Figure 5**). L'origine de ces lésions est essentiellement immunologique et liée aux épisodes de rejets cellulaires mais aussi aux stress ischémiques. L'existence d'un rejet infraclinique au cours de la première année contribue significativement au développement de ces lésions. Après la première année, la nature des lésions change pour laisser apparaître des lésions microvasculaires et glomérulaires. Les lésions artériolaires (hyalinose et fibrose intimale) (**Figure 5**) ont une place centrale dans l'aggravation chronique de la néphropathie d'allogreffe en réduisant la lumière des vaisseaux, et créent une ischémie tissulaire qui contribue à la fibrose interstitielle et à l'atrophie tubulaire. Enfin, la glomérulosclérose s'installe progressivement et représente l'étape ultime et irréversible de destruction de la fonction néphronique (Nankivell et al., 2003, Chapman et al., 2005).

B. Processus biologiques impliqués dans la physiopathologie de la NCT

L'ischémie tissulaire est à l'origine de réactions angiogénique et inflammatoire suivies de phénomènes de réparation fréquemment inadaptés ou incomplets. Ces mécanismes de cicatrisation activent des processus de fibrogenèse via la sécrétion de transforming growth factor β (TGF- β), la production de MEC ou la TEM (Bonventre and Yang, 2011) (**Figure 6**) et sont impliqués dans le développement de l'insuffisance rénale chronique. Dans le cas de la transplantation rénale, l'ischémie contribue à l'établissement de lésions caractéristiques de la NCT, à savoir la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (Nankivell and Chapman, 2006).

Ces agressions ischémiques et immunologiques touchent l'ensemble des cellules du tissu rénal. Ces dernières sont à la fois les cibles et les médiateurs de ces agressions. L'épithélium tubulaire joue un rôle central dans le développement de la NCT, notamment

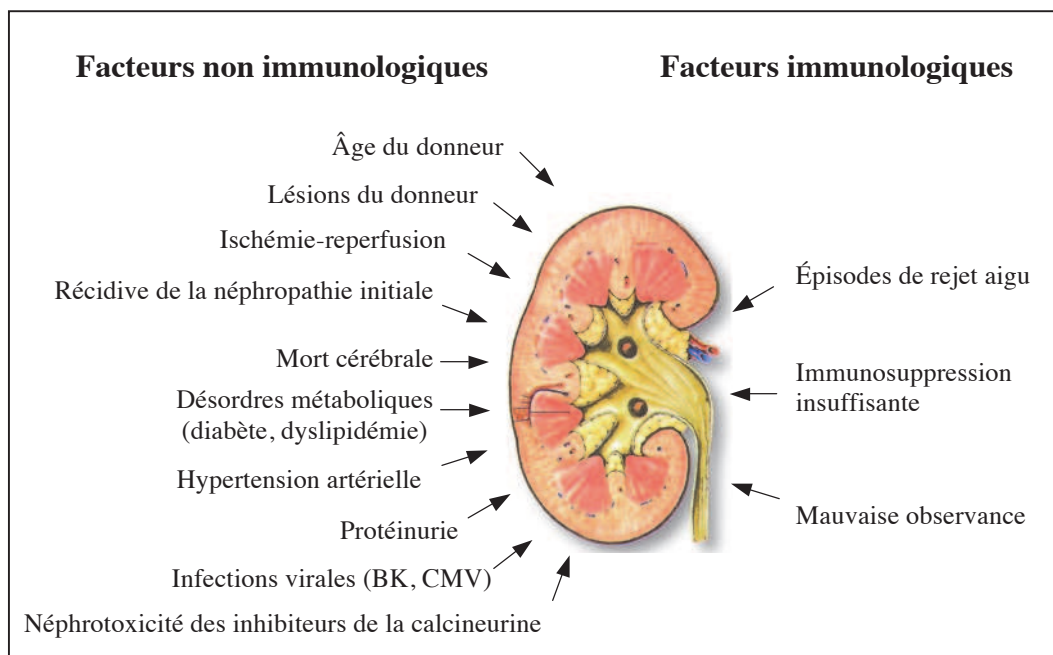


Figure 4 : Facteurs favorisant les lésions chroniques d'allogreffe.

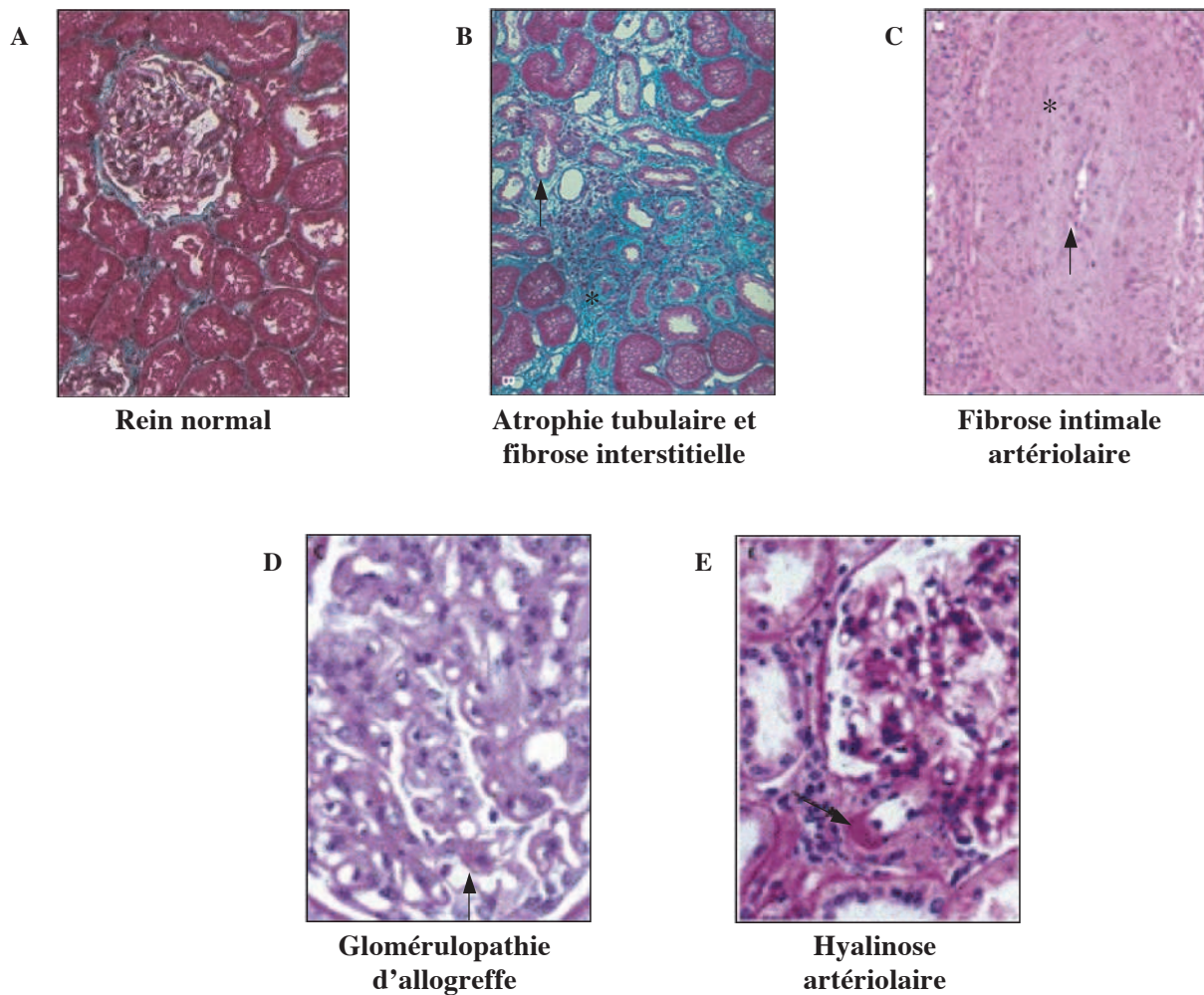


Figure 5 : Lésions élémentaires chroniques d'allogreffe.

L'atteinte chronique d'allogreffe est liée à la constitution de lésions histologiques irréversibles touchant toutes les structures du néphron. L'épithélium des tubules est atrophique (**B**, flèche), l'interstitium est le siège d'un processus fibrosant extensif (**B**, étoile), les parois des artérioles sont épaissies, fibreuses et riches en cellules inflammatoires (**C**, étoile) conduisant à une réduction du diamètre de la lumière (**C**, flèche). Les glomérules sont également atteints avec un épaississement et un dédoublement de la membrane basale (**D**, flèche). Enfin, des dépôts hyalins pouvant être liés au diabète ou à l'hypertension artérielle, sont observés dans la paroi des artérioles (**E**, flèche).

D'après (Colvin, 2003).

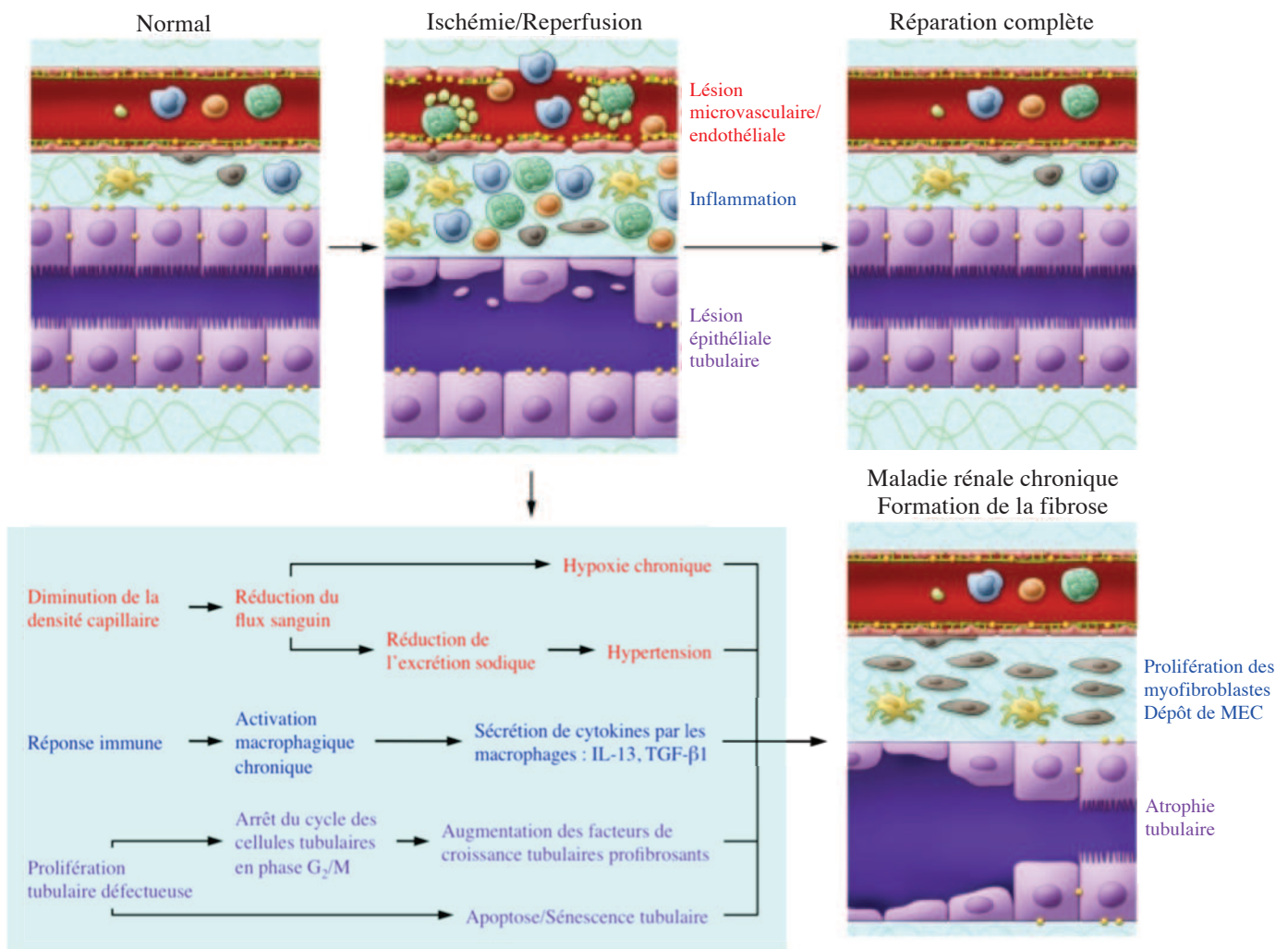


Figure 6 : Réparation anormale dans l'insuffisance rénale aiguë ischémique.

Le processus de réparation secondaire à un épisode d'ischémie-reperfusion peut être incomplètement réalisé et entraîner des lésions fibrosantes qui conduisent progressivement à une dysfonction rénale. La production persistante de cytokines pro-fibrosantes, telles que l'interleukine-13 (IL-13) ou le transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) par les macrophages activés contribue à l'apparition de la fibrose. Le processus de prolifération des cellules épithéliales tubulaires rénales est également altéré, le cycle cellulaire est arrêté en phase G₂/M ce qui induit la sécrétion de facteurs profibrosants (TGF- β 1). La fibrogenèse est ainsi activée et la progression de l'insuffisance rénale chronique est accélérée.

MEC : matrice extracellulaire.

D'après (Bonventre and Yang, 2011).

par la génération d'une réponse inflammatoire, par la production de molécules profibrotiques comme le TGF- β et l'endothéline-1 qui activent les fibroblastes interstitiels et induisent la synthèse de MEC, ou par le biais de la TEM. L'interstitium rénal est également impliqué dans la survenue de la fibrose en particulier par l'infiltration macrophagique interstitielle qui sécrète du TGF- β lors d'épisodes ischémiques.

1. Inflammation

L'inflammation peut être déclenchée dans de nombreuses situations notamment lors d'une infection virale ou secondairement à un épisode ischémique. Les conséquences de la réaction inflammatoire se font principalement par les acteurs de l'immunité innée mais les cellules de l'épithélium rénal contribuent également à l'amplification de cette réponse.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la génération de l'inflammation induite par l'ischémie. Cette dernière active, par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- κ B, la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et MCP-1 (Harari and Liao, 2010). La stimulation des TLR est également impliquée dans la sécrétion de ces médiateurs de l'inflammation lors de situations ischémiques (Wang et al., 2011).

Les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le microenvironnement induisent une sécrétion locale de chimiokines et de molécules d'adhésion permettant le recrutement des cellules de l'inflammation, des lymphocytes et des macrophages. Celles-ci sécrètent également d'autres chimiokines induisant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires résidentes, des neutrophiles et des cellules NK puis des cellules T spécifiques de l'alloantigène, dans les sites lésés (Fine and Norman, 2008). La persistance de la réaction inflammatoire a des conséquences délétères sur le parenchyme rénal puisque l'inflammation chronique est une composante essentielle au développement de la fibrose rénale (Guerrot et al., 2012). L'entretien de cette réaction inflammatoire modifie l'expression des gènes impliqués dans la survie cellulaire et la revascularisation des tissus. Elle contribue aussi à la fibrogenèse rénale.

2. Transforming Growth Factor (TGF- β)

Le TGF- β est une cytokine pro-fibrogénique existant sous trois isoformes. Le TGF- β_1 joue un rôle fondamental dans la fibrogenèse rénale (Yu et al., 2003) et dans l'évolution des néphropathies par ses actions sur la prolifération fibroblastique, la synthèse de MEC et la TEM. En effet, l'induction endogène de TGF- β_1 entraîne la production de la fibronectine et du collagène IV, deux protéines composant la MEC (Qi et al., 2008), ce qui crée un déséquilibre lors du renouvellement de la MEC, provoquant ainsi une accumulation de la MEC qui participe au développement de la fibrose rénale (Yang and Liu, 2001). Il a été montré que l'ischémie rénale induit l'expression du TGF- β dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (Norman and Fine, 2006).

3. Stress oxydant

Les ERO, produites en excès lors d'épisodes d'ischémie-reperfusion, contribuent au développement de la fibrose rénale. Les lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire peuvent être induites par l'intermédiaire de la TEM lors d'un stress oxydant observé au cours de la NCT (Djamali et al., 2005). Les ERO peuvent également induire l'apoptose des cellules épithéliales tubulaires rénales en activant les caspases et en inhibant les protéines anti-apoptotiques. L'activation du stress oxydant et de l'apoptose a été observée dans les zones tubulaires du greffon rénal présentant des lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle (Djamali, 2007). Enfin, les ERO peuvent activer des voies de signalisation pro-inflammatoires comme les voies JNK (c-Jun N terminal Kinase), p38-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et NF- κ B qui vont participer à la fibrogenèse rénale (Djamali, 2007).

4. Apoptose

L'apoptose est un type de mort cellulaire impliquée dans la survenue de lésions des cellules épithéliales tubulaires rénales, et notamment d'atrophie tubulaire, au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Les mécanismes entraînant ces lésions font intervenir les caspases et peuvent conduire à une insuffisance rénale aiguë (Kaushal et al., 2004). Il est également bien établi qu'une période prolongée d'ischémie peut induire l'apoptose des

cellules épithéliales tubulaires *in vivo* (Shimizu and Yamanaka, 1993) et *in vitro* (Wiegele et al., 1998). Un des mécanismes pouvant aboutir à l'apparition de l'apoptose lors d'un épisode ischémique fait intervenir les voies mitochondriales (Tanaka et al., 2003).

5. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La TEM caractérise un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses, ce qui requiert des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. Les cellules tubulaires rénales acquièrent un phénotype myofibroblastique faisant suite à différents phénomènes : la perte d'adhésion intercellulaire et d'expression membranaire de protéines constituant les jonctions intercellulaires, l'expression *de novo* de marqueurs mésenchymateux, la réorganisation du cytosquelette d'actine permettant la migration cellulaire et la production de composants de la MEC (Thiery and Sleeman, 2006).

Les myofibroblastes constituent une source majeure de MEC et leur rôle est bien défini dans le processus de fibrogenèse rénale. Les myofibroblastes peuvent provenir de la conversion de fibroblastes présents localement en myofibroblastes, de fibrocytes dérivant de la moelle osseuse (Broekema et al., 2007) ou de cellules tubulaires soumises à la TEM. Cependant, la contribution de chacune de ces sources dans la production des myofibroblastes reste encore très controversée. En effet, des auteurs considèrent que la TEM ne fournit qu'une part négligeable des myofibroblastes (Kriz et al., 2011) alors que d'autres estiment à environ 30% la proportion de myofibroblastes présents dans le rein ayant comme origine les cellules tubulaires par le processus de TEM (Iwano et al., 2002). La TEM existe chez l'homme au cours de diverses néphropathies mais sa contribution à l'évolution de la fibrose rénale est encore peu étudiée, même si de forts arguments expérimentaux l'impliquent dans la progression de la fibrose interstitielle (Zeisberg and Kalluri, 2004).

De nombreux stimuli extracellulaires peuvent déclencher la TEM, le médiateur essentiel étant le TGF- β . Il a été montré *in vitro* que l'hypoxie, une composante de l'ischémie, peut induire la TEM sur des cellules tubulaires rénales proximales de rat (Manotham et al., 2004) et *in vivo* chez le rat que l'ischémie chronique entraînait une transdifférenciation des cellules tubulaires (Manotham et al., 2004).

6. Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire et l'implantation du placenta mais aussi lors de phénomènes pathologiques, en particulier au cours de la croissance tumorale et du développement des métastases. L'angiogenèse est activée en réponse à l'ischémie pour assurer un apport en oxygène et en nutriments nécessaire et suffisant pour un fonctionnement optimal de l'organe. Elle est contrôlée par plusieurs régulateurs clés : le VEGF, le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) et l'angiogénine (ANG) (Cross and Claesson-Welsh, 2001).

La famille des VEGF est constituée de cinq membres parmi lesquels le VEGFA, appelé plus communément VEGF, régule l'angiogenèse de façon prédominante. Il induit l'angiogenèse dans des conditions physiologiques et pathologiques par l'intermédiaire de deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (VEGF Receptor-1 et 2). VEGFR-2 est le médiateur majeur des réponses induites par VEGF dans les cellules endothéliales. Le VEGF stimule la croissance et l'expansion ainsi que la motilité, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales formant les artères, les veines et les vaisseaux lymphatiques par une action directe sur les cellules (Karamysheva, 2008, Kowanetz and Ferrara, 2006). Le VEGF est essentiel au maintien du compartiment tubulo-interstitiel et empêche la mort des cellules endothéliales et la destruction des capillaires péritubulaires. Il permet également d'assurer l'apport en oxygène et en nutriments (Leonard et al., 2008, Choi et al., 2000, Rudnicki et al., 2009).

Le bFGF, appartenant à la famille des FGF, est l'un des premiers facteurs angiogéniques à avoir été découvert. Il agit via des récepteurs aux FGFs, les FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors), présents à la surface des cellules endothéliales ou indirectement en stimulant la libération de médiateurs angiogéniques, tels que l'angiopoïétine-2 et le VEGFB, à partir d'autres types cellulaires (Carmeliet and Jain, 2011). Le bFGF induit la prolifération, la migration des cellules endothéliales, *in vitro*, et l'angiogenèse tumorale (Bikfalvi et al., 1997).

Le PDGF existe sous forme d'homodimères (PDGF-AA, -BB, -CC et -DD) ou d'hétérodimères (PDGF-AB) et est exprimé par de nombreux types cellulaires. Il stimule la prolifération et la migration des cellules mésangiales et endothéliales en activant les

récepteurs au PDGF (PDGFR- α et - β) (van Roeyen et al., 2012). Il a été montré que le PDGF-C possède un puissant effet angiogénique sur l'endothélium glomérulaire (Boor et al., 2010). Tout comme le bFGF, le PDGF peut également stimuler l'angiogenèse en induisant la production d'autres molécules angiogéniques telles que le VEGF et le bFGF (Ostendorf et al., 2012).

L'angiogénine est un puissant facteur angiogénique agissant à la fois sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Elle joue un rôle important en physiologie mais également dans les maladies tumorales lorsque son expression est anormalement élevée (Tello-Montoliu et al., 2006). L'angiogénine se lie spécifiquement aux cellules endothéliales et stimule leur migration et leur expansion. Elle favorise également leur prolifération et leur différenciation (Wiedlocha, 1999).

Ces médiateurs angiogéniques concourent cependant à un remodelage tissulaire inadéquat en recrutant des leucocytes et en favorisant l'inflammation, la TEM et l'activation fibroblastique (Mayer, 2011, Reinders et al., 2006, Strutz et al., 2002). Ces processus induits dans le rein pourraient contribuer à la fibrogenèse rénale.

III. Mécanismes d'adaptation cellulaire aux stress

Le parenchyme du greffon rénal peut donc activer de multiples mécanismes cellulaires et moléculaires en réponse à ces agressions. Certains de ces mécanismes vont permettre aux cellules de s'adapter et ainsi de réguler l'homéostasie rénale afin de maintenir le bon fonctionnement de l'organe.

La voie d'adaptation la plus connue induite en réponse à l'ischémie est la voie stabilisant le facteur de transcription HIF-1 α qui entraîne la transcription de gènes intervenant dans les réponses à l'hypoxie comme l'angiogenèse, le transport de nutriments, la glycolyse et l'inhibition de l'apoptose (Majmundar et al., 2010). D'autres processus adaptatifs, mis en jeu lors d'une déplétion en nutriments ou en oxygène, impliquent la kinase MTOR. Dans ces circonstances, MTOR est inhibée ce qui a pour conséquence un arrêt de la croissance cellulaire notamment par inhibition de la traduction protéique (Sengupta et al., 2010). Le stress du RE est, quant à lui, activé par l'hypoxie et la carence en nutriments et l'autophagie par la déplétion en acides aminés.

Ces voies d'adaptation n'ont pas seulement un effet bénéfique pour les cellules puisqu'elles peuvent induire d'autres réponses notamment l'immunité innée et le remodelage tissulaire responsable de la fibrogenèse et de l'angiogenèse. Les mécanismes précis de cette régulation reliant les stress ischémiques et immunologiques aux réponses inflammatoire et angiogénique par l'intermédiaire des processus adaptatifs sont encore mal connus. Une meilleure compréhension de ces modes de réponses cellulaires est donc essentielle pour pouvoir les moduler afin d'améliorer la survie du greffon et de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs utilisables en clinique pour un dépistage ou un diagnostic plus précoce de la toxicité rénale.

Dans les parties suivantes (*Parties 2 et 3 de l'Introduction*) seront traitées, respectivement, le stress du RE et l'autophagie. Au sein du laboratoire, les conséquences de l'activation de ces deux processus adaptatifs ont été étudiées lors d'un stress cellulaire induit par la CsA (Pallet et al., 2008b, Pallet et al., 2008a). D'autres facteurs, tels que l'ischémie et l'IFN γ , interviennent également dans le développement de lésions chroniques d'allogreffe mais les mécanismes impliqués dans la survenue de ces modifications du parenchyme rénal restent encore à déterminer. L'ischémie est caractérisée par une carence en oxygène et en nutriments, notamment en glucose et en acides aminés. L'hypoxie et ses conséquences dans l'apparition des lésions rénales ont été largement étudiées alors que les effets de la carence en glucose sur le parenchyme rénal sont plus méconnus. Nous nous sommes donc intéressés au rôle du stress du RE et de l'autophagie dans la régulation de processus favorisant l'apparition de lésions chroniques rénales induits par la carence en glucose et par l'IFN γ .

Partie 2 : Le stress du réticulum endoplasmique

I. Biologie du stress du réticulum endoplasmique (RE)

A. Le RE et le stress du RE

Le RE est un organe intracellulaire dispersé dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et formé d'un réseau membraneux de citernes et de tubules qui communiquent entre eux. Il représente à lui seul plus de la moitié des membranes cellulaires et sa taille varie d'une cellule à l'autre selon l'activité et les besoins de la cellule en protéines. La structure du RE s'établit dans la continuité de la membrane nucléaire et sa lumière constitue un environnement favorable à la synthèse, aux modifications, au repliement et à la maturation des protéines sécrétées, des protéines de la membrane plasmique et des organites intracellulaires. Au cours du processus de production des protéines natives, celles-ci vont être soumises à des contrôles de qualité stricts qui vont s'assurer du bon repliement et de la conformation correcte des protéines. Si ces contrôles sont un succès, les protéines nouvellement synthétisées pourront être transportées à leur destination finale alors que s'ils échouent, les protéines incorrectement repliées ou modifiées seront dégradées par la voie du protéasome (Ellgaard and Helenius, 2003). Produites en excès, les protéines normales ou mal conformées ne pourront pas toutes être transportées ou éliminées et finiront par s'accumuler dans la lumière du RE. Les capacités du RE peuvent être dépassées lors de la synthèse brutale de protéines en grande quantité ce qui conduit à une accumulation de protéines, notamment des immunoglobulines dans les plasmocytes au cours d'une infection virale ou de l'insuline dans les cellules β -pancréatiques lors d'une hyperglycémie.

Le RE, grâce à des pompes calciques ATP-dépendantes ancrées dans sa membrane, est le principal site de réserve calcique de la cellule. Sa lumière présente un environnement oxydatif optimal à la création de ponts disulfures, notamment par la Protein Disulfide Isomerase (PDI), et à la conformation correcte des protéines (Hatahet and Ruddock, 2009). Par ailleurs, la lumière du RE contient de nombreuses protéines chaperonnes et des enzymes spécialisées dans le repliement des protéines dépendantes, pour la majorité, du calcium. Parmi les protéines chaperonnes, la Binding Immunoglobulin Protein (BiP), aussi

connue sous le nom de Glucose Regulated Protein 78 (GRP78), la Glucose Regulated Protein 94 (GRP94), la calréticuline, la calnexine et la protéine EDEM (ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like lectin) stabilisent les intermédiaires incomplètement matures mais détectent également les protéines malformées et les orientent vers la dégradation (Little et al., 1994, Ni and Lee, 2007, Coe and Michalak, 2009).

De nombreuses situations perturbent la maturation protéique, induisant l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, produisant alors une situation de stress appelée stress du RE. Ainsi les anomalies de statut redox, les troubles de l'homéostasie du calcium intra-réticulaire (causés par des inhibiteurs des ATPases calciques tels que la thapsigargine), la carence en glucose, les infections virales, la surcharge en cholestérol, les anomalies de glycosylation des protéines (induites par la tunicamycine) ou certains inhibiteurs enzymatiques interfèrent avec les processus de maturation post-traductionnelle des protéines natives et peuvent induire leur accumulation (Pallet et al., 2009).

Toutes les situations conduisant à une altération de la fonction du RE empêchent la conformation correcte des protéines. Celles-ci ne peuvent plus se diriger vers l'appareil de Golgi et elles s'accumulent dans la lumière du RE obligeant alors la cellule à déclencher une réponse adaptative appelée réponse UPR dont l'objectif est de diminuer la quantité de protéines dans la lumière du RE. La réponse UPR joue un rôle physiologique particulièrement important dans le maintien de l'homéostasie des cellules et plus particulièrement dans celles ayant une activité de synthèse protéique élevée.

B. La réponse UPR (Unfolded Protein Response)

La réponse UPR, lorsqu'elle est activée, a plusieurs conséquences. Elle permet d'adapter les fonctions cellulaires aux modifications de l'environnement et de rétablir une fonction normale du RE en réduisant la synthèse globale des protéines limitant ainsi l'arrivée de nouvelles protéines dans la lumière du RE, en induisant la synthèse de protéines chaperonnes impliquées dans le processus de repliement et en augmentant l'activité de dégradation protéasomale. Cependant, si ce processus adaptatif échoue et que le stress se prolonge, les voies induisant la mort cellulaire programmée seront alors activées (Xu et al., 2005).

La réponse UPR est constituée de trois voies de signalisation impliquant trois protéines transmembranaires : IRE1 α (Inositol Requiring Enzyme 1 α), le facteur de transcription ATF6 (Activated Transcription Factor 6) et la protéine kinase PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase). Dans des conditions physiologiques, la protéine chaperonne BiP, appartenant à la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock Protein), est liée aux domaines luminaux de ces trois médiateurs (**Figure 7**). Lorsqu'un stress survient, BiP se lie aux protéines mal conformées qui se sont accumulées dans la lumière du RE et les dirigent vers la voie ERAD (Endoplasmic-Reticulum Associated Degradation) pour être dégradées par le protéasome. Les protéines transmembranaires ainsi libérées sont activées et entraînent l'activation de voies de régulation traductionnelle et transcriptionnelle (Zhang and Kaufman, 2004, Ron and Walter, 2007). BiP possède une affinité plus élevée pour les protéines mal conformées que pour les trois transducteurs. Ceci fait de lui un régulateur majeur de la réponse UPR (Luo et al., 2006). Néanmoins, des études récentes tendent à nuancer cette théorie en proposant une interaction directe entre IRE1 α et les protéines mal conformées (Walter and Ron, 2011).

L'activation de la voie PERK conduit à la diminution de la traduction des ARNm. Lors d'un stress du RE, la protéine kinase PERK s'oligodimérise ce qui induit une autophosphorylation de son domaine kinase. Elle peut ainsi phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α) et le rendre inactif. La traduction de la majeure partie des ARNm est atténuée et la synthèse globale des protéines est réduite. Certains ARNm sont, au contraire, sélectivement traduits au cours de cette réponse grâce à leurs cadres ouverts de lecture situés dans la région 5' non traduite. C'est le cas du facteur ATF4 (Activated Transcription Factor 4) qui active la transcription de gènes codant des protéines de la réponse UPR tels que BiP et GRP94 ainsi que des protéines du programme de mort cellulaire, comme CHOP (C/EBP HOmologous Protein) (Oyadomari and Mori, 2004) dont les gènes cibles codent GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 34) qui joue un rôle dans la régulation de l'apoptose.

L'induction de la voie IRE1 α entraîne une régulation transcriptionnelle de la réponse UPR. Après oligodimérisation et autophosphorylation, IRE1 α acquiert une activité RNase permettant l'épissage non conventionnel de 26 nucléotides de l'ARNm codant pour le facteur de transcription XBP1 (X-box Binding Protein 1) (Yoshida, 2007a). Une fois l'ARNm traduit, la protéine XBP1 est transloquée dans le noyau et se fixe sur les éléments

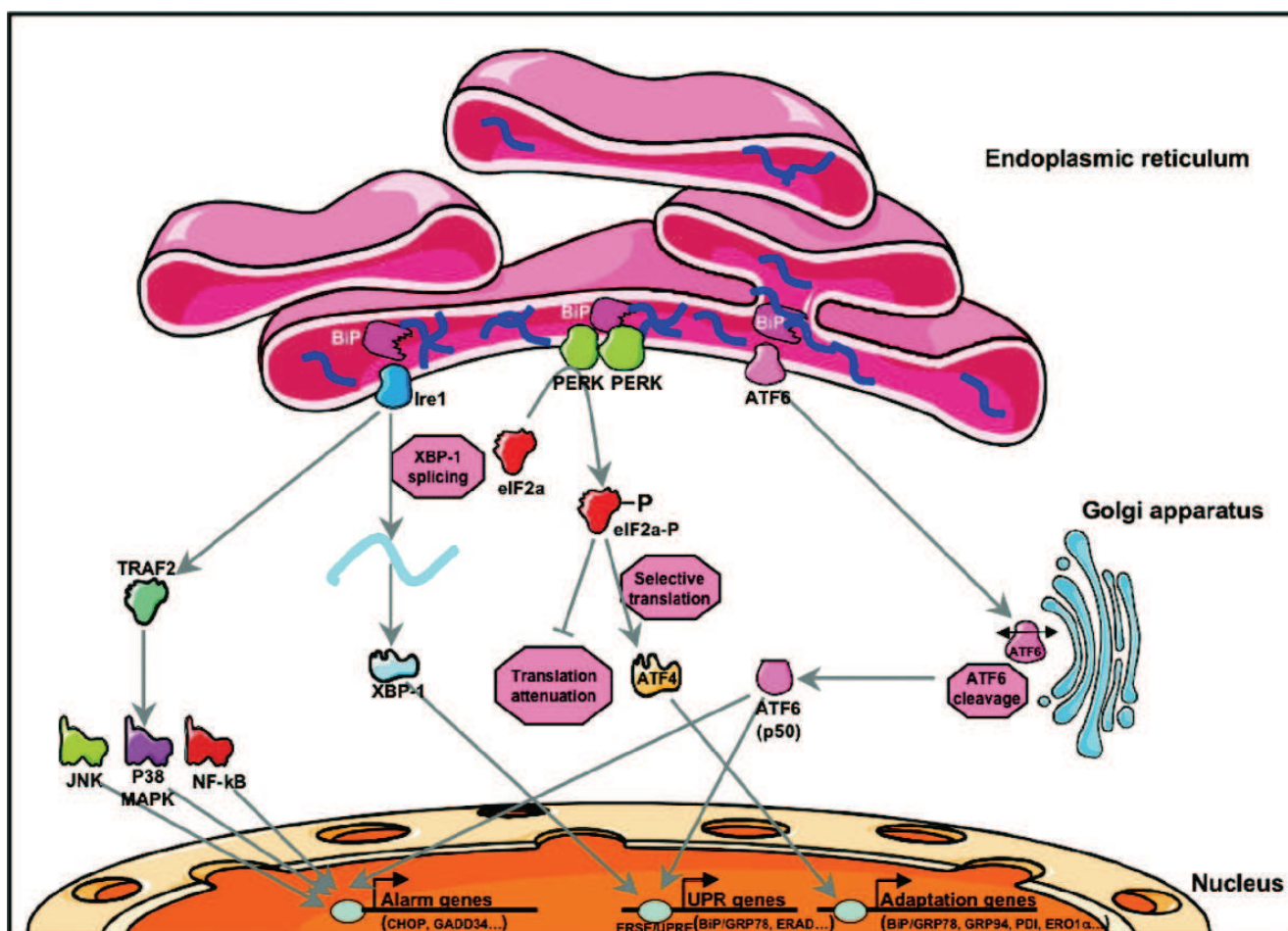


Figure 7 : Représentation schématique de la réponse UPR (Unfolded Protein Response).

Lors de l'accumulation de protéines mal conformées (représentées en bleu sur la figure) dans la lumière du RE, la protéine chaperonne GRP78/BiP se lie préférentiellement à ces protéines malformées et libère les facteurs transactivateurs de la réponse UPR ATF6, IRE1 α et PERK. ATF6 est un facteur transcriptionnel qui sera clivé dans l'appareil de Golgi, puis migrera dans le noyau pour transcrire les gènes codant les protéines chaperonnes comme BiP, GRP94 ou la calnexine. IRE1 α possède une activité RNase qui va permettre l'épissage de l'ARNm du facteur transcriptionnel XBP1, qui lui aussi va permettre la transcription de gènes de l'UPR. Enfin, PERK activée va phosphoryler eIF2 α qui va bloquer la traduction des ARNm, limitant ainsi la synthèse protéique globale, à l'exception du facteur transcriptionnel ATF4, impliqué également dans la transcription de gènes de l'UPR et de gènes de l'apoptose, comme CHOP.

ATF6 : Activating Transcription Factor 6 ; CHOP : C/EBP Homologous Protein ; eIF2 α : eucaryotic Initiation Factor 2 α ; GRP : Glucose Regulated Protein ; IRE1 α : Inositol Requiring Enzyme 1 α ; PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase ; XBP-1 : X-box Binding Protein 1.

D'après (Pallet et al., 2009).

de réponse aux stress du RE (ER stress Response Element [ERSE]) induisant ainsi la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse UPR comme BiP, GRP94, PDI et ORP150 (Oxygen Regulated Protein 150 kD) ainsi que des enzymes intervenant dans la maturation et la dégradation protéique telles que la protéine EDEM (Hosokawa et al., 2001).

L'activation de la voie ATF6 engendre également une régulation transcriptionnelle. Lors d'un stress du RE, ATF6 quitte la membrane du RE et migre, via des vésicules, jusqu'à l'appareil de Golgi où il est clivé par les protéases S1P (site-1 protease) et S2P (site-2 protease). Ce clivage libère une portion cytosolique active de ATF6 (ATF6 p50) capable de se fixer sur les ERSE des gènes codant les chaperonnes impliquées dans la maturation des protéines (Zhang and Kaufman, 2004, Ron and Walter, 2007).

Les conséquences de l'activation concomitante de ces voies à la fois cytoprotectrices et pro-apoptotiques sur la survie cellulaire vont dépendre de leurs intensités respectives, de leur durée mais également du type cellulaire dans lequel survient la réponse UPR.

C. Stress du RE et apoptose

L'activation du stress du RE permet le maintien de l'homéostasie cellulaire mais lorsque le stress est intense et prolongé, la réponse UPR induit un programme de mort cellulaire par apoptose. Les signaux apoptotiques sont initiés dans le RE par différents mécanismes. La voie apoptotique la plus décrite lors d'un stress du RE est celle impliquant le facteur de transcription CHOP, également appelé GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 153), qui est régulé par les facteurs ATF4 et probablement ATF6 (Oyadomari and Mori, 2004) et XBP1 (Tabas and Ron, 2011). Il a été montré, dans des modèles murins, que la délétion du gène *Chop* protège partiellement de la mort cellulaire médiée par un stress du RE, de la toxicité rénale induite par des inducteurs pharmacologiques du stress du RE et de l'apoptose des cellules neuronales induite par l'ischémie (Scheuner and Kaufman, 2008). CHOP peut induire ses effets pro-apoptotiques en activant la transcription de gènes codant des protéines régulant positivement l'apoptose, tels que DR5 (Death Receptor 5), Bim et TRB3 (Tribbles-Related Protein 3) (Yamaguchi and Wang, 2004, Puthalakath et al., 2007, Ohoka et al., 2005), ou en réprimant la transcription de gènes protecteurs. L'activation de l'apoptose peut également être dépendante de la voie IRE1 α . Le domaine cytosolique de IRE1 α interagit avec la protéine

adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2). Cette association permet le recrutement de ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) puis l'activation de JNK (Nishitoh et al., 2002). JNK induit l'apoptose en activant les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), telles que Bim, et en inhibant les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Liu and Lin, 2005, Kim et al., 2008). JNK induit également le relargage du cytochrome c qui permet l'activation de la cascade apoptotique initiée par la caspase 9 (Dhanasekaran and Reddy, 2008) (**Figure 8**).

Dans des conditions physiologiques, l'apoptose induite par le stress du RE a un rôle bénéfique car elle pourrait éliminer les dernières cellules endommagées qui, malgré l'action de la réponse UPR, n'ont pas pu retrouver une fonction normale. L'apoptose peut également servir de mécanisme de défense contre les agents infectieux tels que *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, si l'apoptose induite par le stress du RE persiste, elle peut devenir pathologique.

II. Le stress du RE en pathologie humaine

En plus de son implication en physiologie dans l'adaptation cellulaire à des modifications environnementales, le rôle du stress du RE est reconnu dans la physiopathologie de nombreuses maladies telles que les maladies rénales, le diabète, certaines maladies neurodégénératives, l'athérosclérose, l'ischémie-reperfusion cardiaque ou cérébrale. La mise en évidence de marqueurs du stress du RE en pathologie permettrait de développer des stratégies thérapeutiques ciblant la réponse UPR.

A. Stress du RE et diabète

Les cellules β du pancréas, localisées au sein des îlots de Langerhans, possèdent un RE très développé traduisant leur capacité à sécréter une grande quantité d'insuline. Lorsque ces cellules subissent un stress du RE provoqué, par exemple, par des ERO produites suite à la formation de nombreux ponts disulfures lors d'une synthèse protéique accrue, l'activation de la voie PERK/eIF2 α de la réponse UPR permet une adaptation cellulaire en réduisant la production de nouvelles protéines et par conséquent en diminuant la formation d'ERO (Scheuner and Kaufman, 2008, Eizirik et al., 2008). Il a été décrit que la mutation

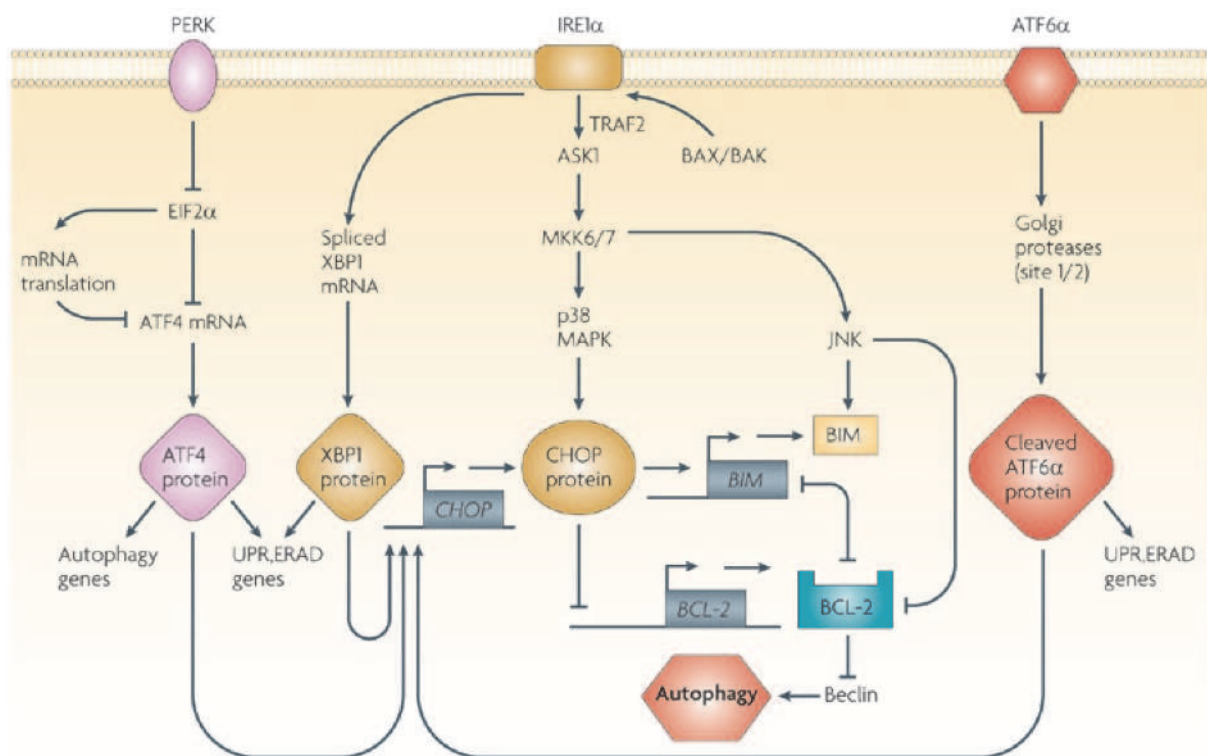


Figure 8 : Relations entre la réponse UPR et les voies de mort cellulaire.

L'activation de IRE1 α entraîne le recrutement de TRAF2 puis l'activation de la kinase ASK1 et la voie des MAP kinases sensibles au stress, telles que p38 MAPK et JNK. Les facteurs de transcription ATF4, XBP1 et ATF6 induisent la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP et p38 MAPK stimule l'activité de CHOP. Ce dernier régule l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose en inhibant la transcription du gène anti-apoptotique Bcl-2 et en induisant la transcription du gène anti-apoptotique Bim. JNK peut également inhiber Bcl-2 et activer Bim.

ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 ; Bcl-2 : B-cell lymphoma-2 ; CHOP : C/EBP Homologous Protein ; IRE1 α : Inositol Requiring Enzyme 1 α ; JNK : Jun N-terminal Kinase ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2

D'après (Kim et al., 2008).

homozygote du gène *PERK* dans un modèle murin induisait la mort des cellules β par apoptose et l'apparition d'un diabète de type 1 conduisant progressivement à une hyperglycémie (Kim et al., 2008). De plus, à partir d'un modèle de souris *Akita* où la mutation du gène *Ins2* codant pour le précurseur de l'insuline entraîne un stress du RE suite à l'accumulation des protéines mutées puis une diminution du nombre de cellules β accompagnée d'une hyperglycémie, Oyadomari et al. ont montré que l'apparition du diabète est retardée lorsque le gène *Chop* est délété de façon homozygote suggérant que la mort cellulaire est en partie dépendante de CHOP (Oyadomari et al., 2002). Ces données mettent en évidence le lien entre la voie PERK/eIF2 α et le développement du diabète de type 1. Aucune donnée ne montre l'implication des voies ATF6 et IRE1 α dans cette pathologie.

Le stress du RE est également mis en jeu dans le diabète de type 2 mais les données de la littérature concernant ce lien potentiel sont complexes. Le diabète de type 2 est caractérisé par une insulino-résistance des tissus périphériques secondaire à un régime riche en acides gras et, à long terme, par une diminution de la synthèse d'insuline par les cellules β . Dans une situation d'insulino-résistance, les besoins en insuline sont augmentés et les capacités de production et de sécrétion de l'insuline dans le RE des cellules β peuvent être insuffisantes. Les cellules β s'adaptent donc à cette demande accrue en activant la réponse UPR. L'inhibition de la réponse UPR, par exemple en utilisant des souris knockout pour le gène *XBPI* spécifiquement dans des cellules β de souris, conduit à une dysfonction des cellules β (Lee et al., 2011). Dans d'autres tissus comme le foie, l'activation de la réponse UPR serait défavorable et conduirait à une altération de la voie de signalisation de l'insuline. Plusieurs études tendent à montrer que l'activation de la réponse UPR est directement associée à l'insulino-résistance. Cependant, la réponse UPR semble réguler la lipogenèse ainsi que les réserves lipidiques. Par conséquent, l'induction de la réponse UPR modifierait l'équilibre lipidique cellulaire et, via l'accumulation d'intermédiaires lipidiques, affecterait la voie de signalisation de l'insuline et conduirait à l'insulino-résistance (Samuel and Shulman, 2012).

B. Stress du RE et ischémie-reperfusion

L'IR peut être observée dans divers contextes, par exemple au moment de la transplantation d'un organe solide, lors d'une occlusion transitoire des artères cérébrales,

d'un infarctus du myocarde ou d'une chirurgie cardiovasculaire. Il a été décrit que le stress du RE est impliqué dans la survenue des lésions d'IR (Xu et al., 2005). L'ischémie entraîne une hypoxie tissulaire et une carence en nutriments, notamment en glucose. Le déficit en ATP causé par l'hypoxie induit une diminution de la concentration intraréticulaire de calcium et une altération de l'activité de BiP et GRP94. L'hypoxie et la carence en glucose sont connues pour induire des dysfonctions des systèmes de maturation des protéines natives aboutissant également à l'activation de la réponse UPR. La reperfusion qui suit l'ischémie provoque un stress oxydatif et la production d'ERO, tels que le monoxyde d'azote, qui altèrent le statut redox, interfèrent avec la formation des ponts disulfures et conduisent à la formation de protéines mal conformées (Sheridan and Bonventre, 2000).

La protéine ORP150, une protéine chaperonne associée au RE, intervient dans les situations d'IR cardiaque, cérébrale ou rénale en jouant un rôle protecteur vis-à-vis de ces agressions. Au niveau cérébral, l'expression de ORP150 est fortement induite dans les astrocytes soumis à une hypoxie et la surexpression de ORP150 dans des cultures de neurones inhibe l'apoptose induite par l'hypoxie (Tamatani et al., 2001, Pallet et al., 2009). Kitano *et al.* ont également montré qu'une heure d'ischémie cérébrale suivie d'une reperfusion entraîne des lésions cérébrales plus importantes dans des souris knockout pour le gène ORP150 que dans des souris transgéniques pour ce même gène, suggérant que ORP150 limite la survenue de lésions et empêche la mort cellulaire. Cependant, l'effet bénéfique de ORP150 n'est plus observé lorsque l'ischémie est prolongée (Kitano et al., 2004).

De plus, au niveau cardiaque, l'homéostasie calcique intracellulaire est impliquée dans l'activité contractile du cœur. Lorsque l'équilibre calcique est perturbé dans les cardiomyocytes, la machinerie apoptotique peut être activée et induire la mort de ces cellules. La protéine ORP150 pourrait intervenir dans la régulation du calcium intracellulaire des cardiomyocytes. En effet, la surexpression de la protéine ORP150 dans des cellules musculaires cardiaques de rat maintient l'homéostasie calcique suite à des épisodes d'IR. Il a aussi été démontré, *in vitro* et *in vivo*, que l'hypoxie des cardiomyocytes induit l'expression de ORP150 et que l'inhibition de cette protéine augmente la mort des cellules par apoptose, indiquant le rôle cytoprotecteur de ORP150 dans les cardiomyocytes (Aleshin et al., 2005).

Enfin, ORP150 est également impliquée dans la survenue de lésions rénales d'IR. Ces données sont relatées ci-après, dans le paragraphe III.B.

C. Stress du RE et maladies neurodégénératives

Divers travaux mettent en évidence le rôle du stress du RE dans la survenue des maladies neurodégénératives. L'accumulation de protéines mal conformées comme le peptide β -amyloïde, l' α -synucléine et la huntingtine est associée à une mort sélective des cellules neuronales dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington respectivement. Dans la maladie d'Alzheimer, les protéines préséniline-1 et 2 (PS-1 et PS-2) interviennent dans la production du peptide β -amyloïde. Il a été observé des anomalies de régulation du calcium intraréticulaire dans des souris knockin pour la protéine mutée PS-1 et une augmentation de la mort des cellules neuronales via l'induction de la protéine CHOP. L'augmentation de CHOP pourrait contribuer à la pathogenèse de ces protéines mutées en rendant les cellules neuronales plus sensibles à l'apoptose induite par le stress du RE (Oyadomari and Mori, 2004, Yoshida, 2007b). De plus, la protéine PS-1 peut se lier à IRE1 et l'inhiber ce qui réduit la réactivité du RE face à un stress (Lindholm et al., 2006).

Dans la maladie de Parkinson, le lien entre l' α -synucléine et le stress du RE n'a pas été établi. En revanche, la mutation de la protéine Parkin, une protéine ligase ubiquitine-like impliquée dans le système de dégradation ERAD, semble associée à l'apoptose induite par le stress du RE. En effet, l'expression de la protéine Parkin est augmentée lors d'un stress RE et la surexpression de Parkin non mutée dans les cellules neuronales leur confère une résistance au stress du RE en inhibant la mort cellulaire (Oyadomari and Mori, 2004, Doyle et al., 2011).

D. Stress du RE et cancer

Lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses doivent faire face à un microenvironnement, caractérisé notamment par une hypoxie et une carence en nutriments, qui n'est pas favorable à leur croissance et à leur survie. De nombreux travaux effectués sur des cellules humaines tumorales, des lignées cellulaires ou des modèles animaux notamment de cancer du sein, de carcinome hépatocellulaire, de tumeur gastrique ou

d'adénocarcinome de l'œsophage, ont montré une activation du stress du RE par ces modifications environnementales et ont mis en évidence le rôle de la réponse UPR dans le maintien de la survie des cellules cancéreuses (Li et al., 2011b, Tsai and Weissman, 2010).

Dans des conditions d'hypoxie, il a été décrit que la voie IRE1-XBP1 de la réponse UPR est impliquée dans la survie et la croissance tumorale. En effet, la déficience du gène *XBPI* entraîne une augmentation de la mort cellulaire induite par le stress du RE dans des fibroblastes embryonnaires murins et empêche la croissance tumorale chez la souris dans laquelle une tumeur a été transplantée (Romero-Ramirez et al., 2004). Il a aussi été montré, lors d'une hypoxie, que la voie PERK permet aux cellules tumorales de survivre en bloquant son cycle cellulaire et en inhibant la synthèse protéique. Blais et al. ont montré que la viabilité des cellules tumorales déficientes pour le gène *Perk* est plus faible et que les tumeurs formées sont plus petites que pour les tumeurs PERK^{+/+} (Blais et al., 2006).

Des données émergentes concernant la réponse UPR en tant que cible thérapeutique dans le myélome multiple montrent, dans une lignée humaine de ce type d'hémopathie maligne, que l'inhibition de l'épissage de XBP1 par le MKC-3946 augmente la cytotoxicité du bortezomib, une molécule anticancéreuse utilisée dans le traitement du myélome multiple et inducteur du stress du RE. L'inhibition de la voie IRE1 simultanément à l'induction du stress du RE entraîne une activation plus importante de la voie PERK, une augmentation de l'expression de CHOP et finalement l'apoptose de ces cellules (Mimura et al., 2012).

Les cellules tumorales confrontées à un microenvironnement ischémique activent d'autres phénomènes comme l'angiogenèse qui va permettre la croissance et la prolifération de ces cellules ainsi que le développement de métastases grâce à la synthèse d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins. Plusieurs travaux en cancérologie mettent en évidence un lien entre le stress du RE et l'angiogenèse lors du développement tumoral. L'activation du stress du RE et de la réponse UPR par l'hypoxie ou d'autres inducteurs connus du stress du RE, entraîne la production de facteur pro-angiogéniques et contribue au processus de néovascularisation (Marjon et al., 2004, Pereira et al., 2010). En effet, il a été montré que l'expression du VEGFA est augmentée lors d'un stress du RE (Abcouwer et al., 2002) et que la sécrétion est dépendante de la protéine chaperonne ORP150 (Moenner et al., 2007). De plus, Drogat et al. ont mis en évidence que l'augmentation de

l'expression de VEGFA induite par l'hypoxie et la carence en glucose est dépendante de la voie IRE1 dans plusieurs lignées humaines de carcinome pulmonaire (Drogat et al., 2007).

Cependant, le rôle de la réponse UPR dans la sécrétion de ces facteurs pro-angiogéniques reste encore peu connu en physiopathologie rénale.

III. Le stress du RE au cours des néphropathies

Le stress du RE est un processus adaptatif important dans le rein puisqu'il permet de protéger les cellules du parenchyme des agressions diverses auxquelles il est soumis. Le stress du RE a aussi été décrit dans plusieurs situations pathologiques et dans tous les types cellulaires mais son rôle dans le développement et l'évolution des maladies rénales aiguës ou chroniques est un domaine encore peu étudié. La mise en évidence de ce mécanisme d'adaptation aux stress environnementaux est importante car il peut constituer une cible thérapeutique à visée néphroprotectrice intéressante, ainsi qu'une source de biomarqueurs de souffrance tissulaire.

A. Stress du RE et glomérulopathies

Différents travaux ont mis en évidence l'induction du stress du RE dans les podocytes de modèles animaux de néphropathie membraneuse, telle que la néphrite de Heymann, et de syndrome néphrotique induit par la puromycine. Au cours de la néphrite de Heymann, caractérisée par des dépôts de complexes immuns dans les cellules épithéliales glomérulaires, ceux-ci activent le complément ce qui induit la formation et l'activation du complexe d'attaque du complément C5b-C9 et conduit à l'apparition de lésions podocytaires. Il a été montré que le complexe C5b-C9 augmente l'expression de BiP et GRP94 dans des cellules épithéliales glomérulaires *in vitro* et *in vivo* chez le rat, et que l'inhibition de BiP entraîne l'apparition de lésions glomérulaires induite par le complément, suggérant un rôle protecteur de cette protéine chaperonne (Cybulsky et al., 2002, Dickhout and Krepinsky, 2009). Dans un modèle de syndrome néphrotique induit par la puromycine chez le rat, il a été observé que la protéinurie active le stress du RE dans les podocytes, avec une augmentation de l'expression de BiP et entraîne une localisation anormale de la néphrine, protéine constituant le diaphragme de fente et essentielle au

maintien de la fonction de filtration glomérulaire, dans le cytoplasme, suggérant que le stress du RE est associé aux lésions podocytaires (Inagi, 2009). De plus, des études *in vitro* ont montré que l'induction du stress du RE par une carence en glucose perturbe la conformation normale de la néphrine et inhibe son transport jusqu'à la membrane plasmique des podocytes (Fujii et al., 2006, Pallet et al., 2009).

B. Stress du RE et lésions tubulaires

L'implication du stress du RE dans la survenue de lésions tubulaires rénales a été observée dans différentes situations. Ohse *et al.* ont montré, dans un modèle *in vitro* de cellules tubulaires proximales, que la surcharge en albumine induit, concomitamment, un stress du RE et l'apoptose de ces cellules via l'activation de la caspase 12. Ces résultats ont également été obtenus dans un modèle *in vivo* de protéinurie induite par la puromycine chez le rat (Ohse et al., 2006). L'IR rénale est aussi responsable de lésions tubulaires induites via le stress du RE. En effet, l'expression de la protéine chaperonne ORP150 est augmentée dans l'épithélium rénal de patients atteints d'insuffisance rénale aiguë. De plus, ORP150 est surexprimée dans la partie ascendante large de l'anse de Henlé dans un modèle de lésions d'IR rénale chez le rat ainsi que dans des cellules tubulaires rénales soumises à une hypoxie. Ces mêmes cellules knockdown pour le gène *ORP150* sont plus sensibles à la mort induite par l'hypoxie que les cellules normales alors que la surexpression de *ORP150* dans des souris transgéniques entraîne une résistance vis-à-vis des lésions rénales induites par l'IR, mettant ainsi en évidence le rôle protecteur de la protéine ORP150 (Bando et al., 2004). Enfin, le stress du RE intervient dans la néphrotoxicité de nombreux composés médicamenteux. Un surdosage en paracétamol provoque une mort des cellules épithéliales tubulaires proximales par apoptose dépendante du stress du RE. Ce dernier est associé à une augmentation de l'expression de CHOP et au clivage de la caspase 12 (Lorz et al., 2004). Au sein du laboratoire, il a été montré que la néphrotoxicité de la CsA, immunosuppresseur utilisé en transplantation rénale, est directement reliée au stress du RE. La CsA est responsable de modifications phénotypiques épithéliales, conduisant à la production de protomyofibroblastes indépendamment de la voie TGF- β , ainsi que de la mort des cellules induite par le stress du RE (Pallet et al., 2008a).

IV. Le stress du RE dans l'inflammation

Une littérature émergente suggère que le stress du RE et la réponse UPR sont liés à l'inflammation par divers mécanismes comme la production d'ERO ou l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de la protéine kinase JNK.

Les ERO sont d'importants activateurs de l'inflammation et le stress du RE serait un médiateur du stress oxydant caractérisé par la génération et l'accumulation d'ERO intracellulaires. Pour obtenir une conformation correcte des protéines, le repliement de celles-ci dans le RE nécessite la formation de ponts disulfures qui se fait grâce aux enzymes PDI et ERO1 (ER Oxidoreductin 1) (Zhang and Kaufman, 2008). L'action de ces enzymes entraîne la production d'ERO. Une augmentation accrue du repliement des protéines dans le RE conduit donc à une accumulation d'ERO, ce qui peut initier l'inflammation. Cependant, en réponse au stress du RE, les cellules activent la réponse UPR pour limiter l'accumulation des ERO. L'activation de la voie PERK entraîne la transcription sélective du facteur ATF4 ainsi que la phosphorylation de NRF2 (Nuclear factor-erythroid-derived 2 (NF-E2)-Related Factor 2) ce qui induit la transcription de gènes anti-oxydants. Il a été montré que la tunicamycine, inducteur du stress du RE, induit une faible accumulation d'ERO dans des cellules wild-type alors qu'elle entraîne une accumulation massive et délétère d'ERO dans les cellules ayant une activité nulle de PERK (Harding et al., 2003, Cullinan and Diehl, 2004).

Le stress du RE participe également à la réaction inflammatoire en activant, par différentes voies, le facteur de transcription NF- κ B et la transcription des gènes de l'inflammation. En absence de stimuli inflammatoires, NF- κ B, constitué des sous-unités p50 et p65/RelA, est sous forme inactive dans le cytoplasme, lié à un inhibiteur de NF- κ B (I κ B) exprimé de façon constitutive. En réponse au stress du RE, le domaine cytoplasmique de IRE1 α se complexe avec l'I κ B kinase (IKK) grâce à la protéine adaptatrice TRAF2. Cette interaction entraîne la phosphorylation activatrice de IKK qui va elle-même induire la phosphorylation inhibitrice de I κ B α . I κ B α se dissocie alors de NF- κ B ce qui conduit à la dégradation de I κ B par le protéasome et à la translocation de NF- κ B dans le noyau (**Figure 9**) (Hasnain et al., 2012). Le complexe IRE1 α /TRAF2 permet également le recrutement de la kinase JNK, l'activation de la voie Akt et la translocation de NF- κ B suite à la phosphorylation de I κ B (Urano et al., 2000). De plus, l'activation de

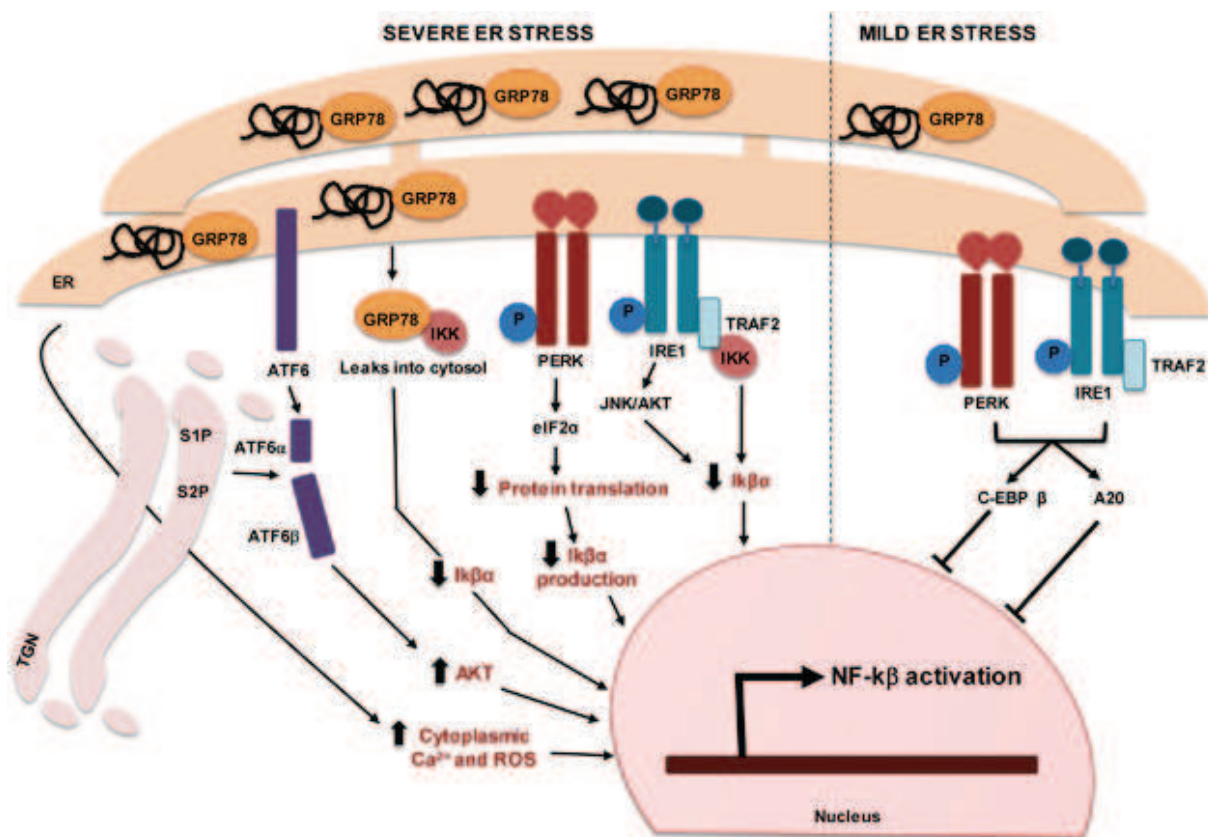


Figure 9 : La réponse UPR et l'activation de NF-κB.

L'activation de ATF6 entraine son interaction avec Akt pour activer le facteur de transcription NF-κB. L'autophosphorylation de PERK conduit à l'inhibition de la traduction des protéines et donc à la diminution de la production de IκB ce qui permet l'activation de NF-κB. L'oligodimérisation activatrice de IRE1 permet sa liaison avec TRAF2, puis le recrutement de JNK et l'activation de la voie Akt ainsi que le recrutement et la phosphorylation activatrice de l'IκB kinase (IKK). Ces deux voies conduisent à la dégradation de IκB, inhibiteur de NF-κB et donc à l'activation de NF-κB. Cependant, lorsque le stress du RE est peu intense, l'activation de PERK et IRE1α entraine la production de C/EBPβ et de A20. Ces derniers inhibent l'activation de NF-κB en réponse à des stimuli inflammatoires.

ATF6 : Activating Transcription Factor 6 ; C/EBPβ : Ccaat-Enhancer Binding Protein ; IRE1 : Inositol Requiring Enzyme 1 ; NF-κB : Nuclear Factor-κB ; PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase.

D'après (Hasnain et al., 2012).

PERK entraîne la diminution de la traduction des ARNm et réduit donc la synthèse de I κ B. Le ratio NF- κ B/I κ B est augmenté et NF- κ B libre peut migrer dans le noyau (Zhang and Kaufman, 2008). L'activation de ATF6 active également la voie Akt/NF- κ B par un mécanisme encore méconnu (Yamazaki et al., 2009). Enfin, un autre processus impliquant la fuite de GRP78 dans le cytosol pourrait être impliqué dans l'activation de NF- κ B. GRP78 interagirait directement avec IKK pour finalement libérer NF- κ B (Hasnain et al., 2012).

Le stress du RE pourrait également contribuer à la génération de l'inflammation par un mécanisme indépendant de NF- κ B. En effet, la thapsigargine, un inducteur connu du stress du RE, entraîne une augmentation de l'expression de la calréticuline à la surface cellulaire augmentant ainsi la phagocytose de ces cellules par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et la production de cytokines inflammatoires par les CPA (Peters and Raghavan, 2011).

L'inflammation joue un rôle important dans le développement des maladies rénales chroniques et le rôle du stress du RE dans la génération d'une réponse inflammatoire en pathologie rénale reste encore méconnu. Il serait donc intéressant d'étudier le lien entre ces mécanismes afin d'évaluer l'implication du stress du RE au cours des néphropathies.

V. Stress du RE et autophagie

Avec le système ERAD associé au protéasome, l'autophagie constitue un mécanisme de dégradation majeur des cellules eucaryotes. L'autophagie est un processus de dégradation hautement régulé impliqué dans le renouvellement des macromolécules et des organites intracellulaires et peut être une voie alternative dont dispose la cellule pour éliminer les protéines mal conformées qui s'accumuleraient dans le RE et qui ne pourraient pas être dégradées par le système ERAD.

Les premières études mettant en évidence l'activation de l'autophagie par le stress du RE ont été effectuées chez la levure. Yorimitsu *et al.* ont montré que le dithiotréitol et la tunicamycine, deux inducteurs connus du stress du RE, entraînent, à la fois, la synthèse de Kar2 (homologue de BiP) et la formation de vacuoles autophagiques dans le modèle *S. cerevisiae* (Yorimitsu et al., 2006). Il a aussi été observé, dans des cellules tubulaires proximales rénales humaines et de rat, une activation de l'autophagie par la formation

d'autophagosomes secondairement à un stress du RE (Kawakami et al., 2009, Pallet et al., 2008b).

Les trois voies de la réponse UPR, PERK, IRE1 et ATF6, activées lors d'un stress du RE, semblent activer l'autophagie. En effet, en réponse à l'hypoxie, l'activation de PERK entraîne la transcription des gènes codant deux protéines de l'autophagie LC3 (Light Chain 3) et Atg5 via l'action respective des facteurs de transcription ATF4 et CHOP sélectivement traduits (Rouschop et al., 2010). De plus, l'induction de PERK réduit la traduction de I κ B et active NF- κ B qui pourrait contribuer au processus autophagique (Kroemer et al., 2010). Enfin, il a été montré que la voie IRE1 α est nécessaire à l'activation de l'autophagie par le stress du RE. Dans des fibroblastes embryonnaires murins déficients pour le gène IRE1 α , il n'a pas été observé d'accumulation de LC3 lors d'un stress du RE induit par la thapsigargine (Ogata et al., 2006). Cependant, d'autres données montrent qu'un stress du RE prolongé inhibe le flux autophagique. En effet, l'inhibition de la kinase IRE1 dans une lignée cellulaire de neuroblastome augmente la conversion de LC3-I et LC3-II après 24h d'exposition à la thapsigargine (Lee et al., 2012).

La stimulation des différents acteurs du stress du RE n'a donc pas les mêmes conséquences sur le processus autophagique. Elles varient selon le type cellulaire, la nature des stimuli induisant le stress du RE et l'autophagie mais aussi la durée et l'intensité d'activation du stress.

I. Généralités sur l'autophagie

Le terme autophagie, qui signifie littéralement « se manger soi-même », englobe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires, organites et macromolécules, par le lysosome. Les produits de dégradation formés sont recyclés pour la synthèse de nouvelles protéines et pour la production d'énergie nécessaire à la cellule.

Il existe plusieurs types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes et la macroautophagie (**Figure 10**). La microautophagie a lieu directement au sein du lysosome. La membrane lysosomale s'invagine et entraîne la séquestration puis la dégradation de certains composants cytosoliques à l'intérieur du lysosome, tels que des corps multivésiculaires formés par endocytose, des mitochondries. La microautophagie permet également l'approvisionnement des lysosomes en glycogène (Li et al., 2012).

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes implique la translocation directe des substrats protéiques solubles mal conformés à travers la membrane du lysosome grâce à l'intervention de protéines chaperonnes telles que HSP90 (Heat Shock Protein) et HSC70 (Heat Shock Cognate protein), qui permettent d'acheminer les protéines altérées jusqu'au lysosome, et du récepteur membranaire LAMP-2A (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A) qui permet l'entrée des protéines dans le lysosome. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes entraîne la dégradation de protéines endommagées portant des motifs KFERQ, telles que le peptide β -amyloïde, reconnus par LAMP-2 et de protéines non essentielles produisant des acides aminés qui serviront à la synthèse de protéines essentielles (Li et al., 2011a).

La macroautophagie, appelée plus communément autophagie, permet la dégradation de complexes protéiques à demi-vie longue et d'organites endommagés. Le principe général de l'autophagie consiste en la séquestration d'une partie du cytoplasme dans une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, qui va fusionner avec le lysosome, pour former un autolysosome (aussi appelé autophagolysosome). Le matériel séquestré est alors hydrolysé par les enzymes lysosomales, notamment par des hydrolases, puis libéré dans le

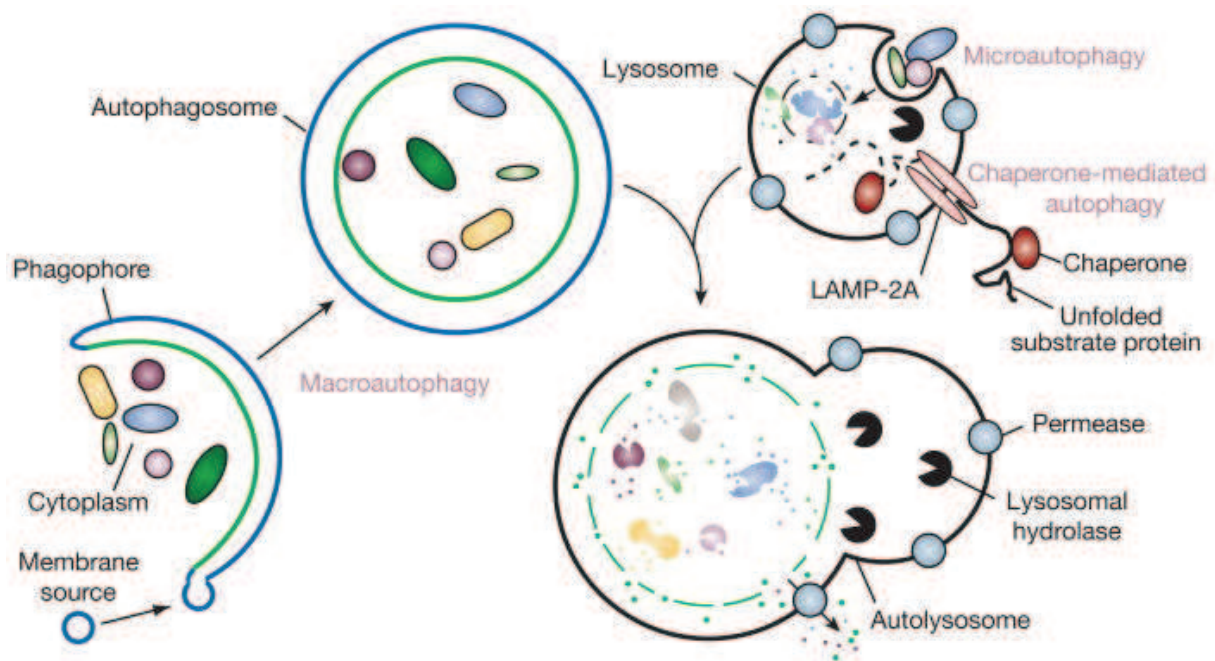


Figure 10 : Les différents types d'autophagie.

La microautophagie est caractérisée par la séquestration directe de constituants cytosoliques par les lysosomes suite à l'invagination de la membrane lysosomale. L'autophagie dépendante des chaperonnes implique la translocation directe des protéines mal conformées solubles à travers la membrane lysosomale grâce à l'action des chaperonnes lysosomales et cytosoliques HSC70, qui acheminent les protéines jusqu'au lysosome, et du récepteur membranaire LAMP-2 qui permet l'entrée des protéines dans le lysosome. Dans le cas de la macroautophagie, les constituants cellulaires sont séquestrés dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome formé par élongation du phagophore. L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome. Les hydrolases contenues dans le lysosome permettent la lyse de la membrane interne de l'autophagosome et la dégradation du contenu séquestré. Les produits de dégradation sont ensuite libérés dans le cytosol.

HSC70 : Heat Shock Cognate protein 70 kDa ; LAMP-2 : Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A.

D'après (Mizushima et al., 2008).

cytoplasme suite à la dégradation de la membrane de l'autolysosome (Xie and Klionsky, 2007). L'autophagie agit en parallèle du système ubiquitine-protéasome, une autre voie de dégradation protéique qui dégrade les protéines à demi-vie courte et les protéines mal conformées grâce à un ensemble d'enzymes d'ubiquitination et d'un complexe protéique multimérique appelé protéasome (Wilkinson, 2000). Jusqu'à la fin des années 90, une très grande attention a été portée au système ubiquitine-protéasome. Cependant, la découverte des gènes Atg (AuTophagy-related genes) de l'autophagie au milieu des années 1990 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Tsukada and Ohsumi, 1993, Klionsky et al., 2003) a permis d'accroître la recherche sur l'autophagie et a montré l'importance du rôle de ce processus dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

L'autophagie existe à un niveau basal et permet de maintenir l'homéostasie cellulaire grâce à ses propriétés de dégradation des protéines et de renouvellement des organites (Kuma and Mizushima, 2010). Elle peut être activée en situations de stress, telles que la carence en acides aminés ou en facteurs de croissance (l'insuline par exemple), l'hypoxie ou le stress du RE, et permet ainsi aux cellules de s'adapter et de survivre à des modifications de l'environnement. Elle participe à la défense des cellules de l'organisme contre les maladies infectieuses, inflammatoires, neurodégénératives et néoplasiques (Levine and Kroemer, 2008).

L'autophagie joue également un rôle important dans certaines pathologies humaines, telles que le cancer, les myopathies, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiaques et hépatiques, les pathologies gastro-intestinales puisqu'un dysfonctionnement du processus autophagique peut être à l'origine de pathologies telles que la maladie de Crohn, de maladies métaboliques et de maladies liées à l'âge (Tanaka et al., 2012).

II. Biologie de l'autophagie

Plus de 30 gènes régulant l'autophagie sont décrits chez la levure et nombreux sont ceux qui possèdent des orthologues chez les mammifères.

A. Initiation de l'autophagie

Lors de l'étape initiale du processus d'autophagie, les composants du cytoplasme, incluant protéines et organites intracellulaires, sont enveloppés par une membrane, appelée phagophore. L'origine exacte de cette membrane isolée n'est pas encore totalement identifiée. Du fait de la proximité des autophagosomes et du RE, celui-ci peut être une des sources du phagophore mais cette membrane peut aussi provenir de la membrane externe mitochondriale ou de la membrane plasmique (Tooze and Yoshimori, 2010).

L'initiation de l'autophagie fait intervenir de nombreux acteurs rassemblés en trois complexes qui interagissent entre eux (**Figure 11**). Tout d'abord, le complexe MTORC1 (Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1), constitué de la protéine kinase MTOR, Raptor (Regulatory associated protein of MTOR), mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 Protein 8), Deptor (DEP domain-containing MTOR-interacting protein) et PRAS40 (Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa), interagit avec le complexe ULK (UNC-51-like Kinase) composé des protéines ULK1/2, Atg13, FIP200 (FAK(Focal adhesion kinase) family Interacting Protein of 200 kD) et Atg101. MTORC1 possède une activité kinase et inhibe par phosphorylation les protéines ULK1/2 et Atg13. A l'inverse, lorsque MTORC1 est inhibé, par une carence en acides aminés par exemple, il se dissocie du complexe ULK. La protéine ULK1/2 devient alors active et peut phosphoryler la protéine Ambra1, un des composants du complexe PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase) de classe III. Ce dernier est formé, en plus de Ambra1, de Beclin-1 (connu sous le nom de Atg6 chez la levure), de Atg14 (aussi appelé Atg14L ou Barkor), de Vps15 et de Vps34 (Vacuolar protein sorting 15 et 34), une PI3K de classe III. La formation de ce complexe est indispensable à l'activation de Vps34 qui permet la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et à l'initiation de l'autophagie (Kroemer et al., 2010, Mizushima et al., 2011). PI3P est une molécule lipidique importante dans la formation des autophagosomes car elle contrôle leur biogenèse et leur maturation en recrutant les protéines nécessaires à l'élongation du phagophore (Burman and Ktistakis, 2010).

L'étude de l'initiation de l'autophagie dans des modèles animaux ou cellulaires implique généralement l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie tels que la 3-méthyladénine, la wortmannine ou le LY294002 qui sont des inhibiteurs des PI3K (Wu et al., 2010, Blommaert et al., 1997), mais également des siRNA invalidant le gène *Beclin-1* permettant ainsi l'inhibition de la formation des autophagosomes.

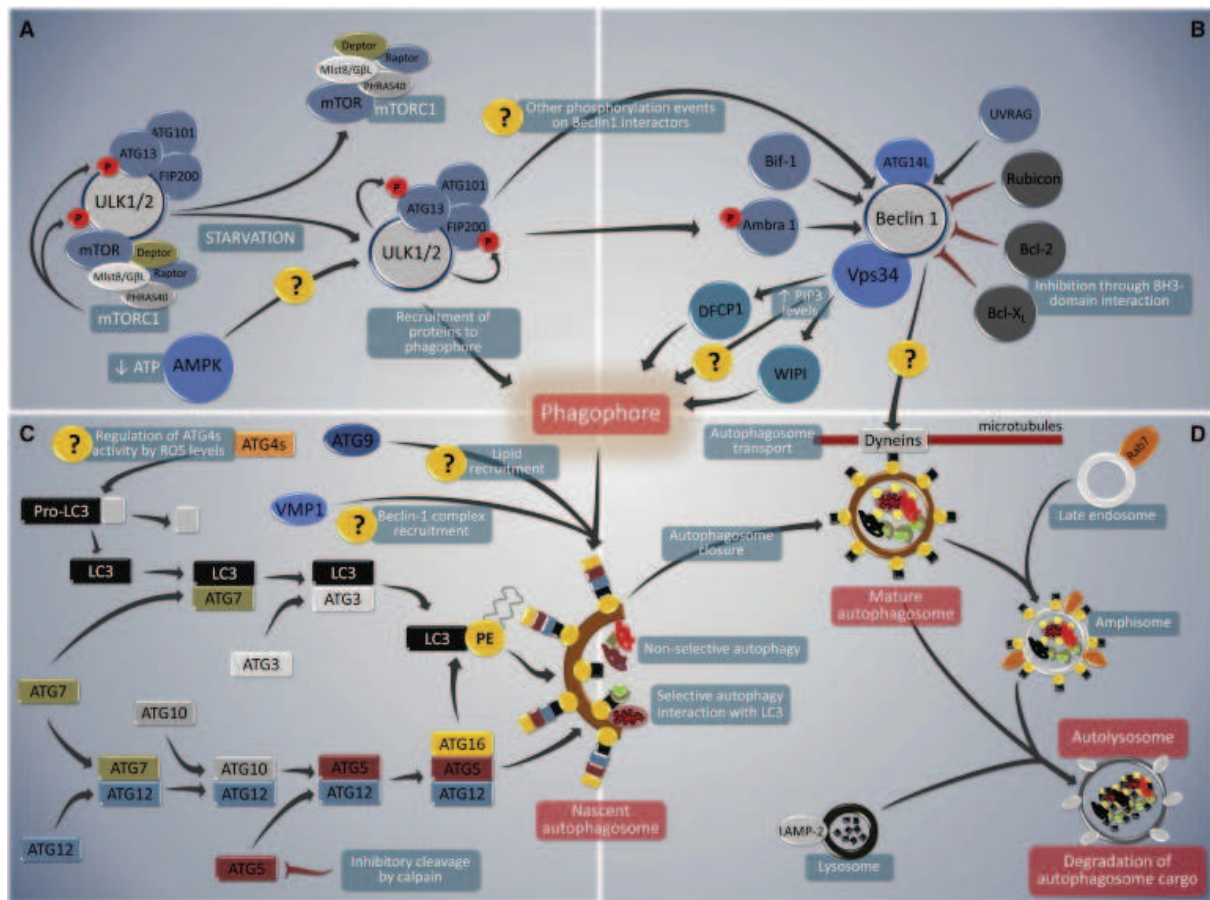


Figure 11 : La machinerie autophagique et ses principaux acteurs.

De nombreux acteurs participent aux étapes de l'autophagie : initiation, élongation, maturation et fusion. (A) Les inducteurs de l'autophagie, tels que la carence en nutriments, entraînent la dissociation de TORC1 et du complexe ULK1/2. (B) Ce dernier, une fois activé, entraîne la phosphorylation de Ambra1 et stimule l'activité de Beclin-1, deux constituants du complexe PI3K de classe III. Beclin-1 interagit avec des facteurs activateurs (bleu) et inhibiteurs (gris) qui régulent la liaison de Beclin-1 à Vps34, l'unité catalytique du complexe PI3K. (C) En plus de ces deux complexes, la formation des autophagosomes à partir du phagophore requiert l'intervention de deux systèmes de conjugaison « ubiquitine-like » impliquant les protéines Atg12 et LC3. La protéine LC3 est nécessaire au transport et à la maturation des autophagosomes ainsi qu'à la sélection des substrats destinés à être dégradés par l'autophagie. (D) Les autophagosomes complètement matures fusionnent avec les endosomes tardifs pour former des amphisomes. Enfin, les autophagosomes ou les amphisomes fusionnent avec les lysosomes ce qui aboutit à la formation d'autolysosomes. Ces derniers, grâce à leur activité d'hydrolyse, dégradent le matériel séquestré qui est ensuite recyclé pour synthétiser de nouvelles molécules au sein de la cellule.

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase ; TORC1 : Target of Rapamycine Complex 1 ; ULK : UNC-51-like Kinase.

D'après (Kroemer et al., 2010).

B. Elongation

Une fois l'autophagie initiée, le phagophore s'allonge pour aboutir à la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, contenant des macromolécules et des organites endommagés.

Deux systèmes de conjugaison « ubiquitin-like » sont impliqués dans l'élongation des structures pré-autophagosomales. La première voie entraîne la liaison covalente de Atg12 à Atg5 grâce à la participation de Atg7 (E1-like enzyme) et de Atg10 (E2-like enzyme). Atg16L se fixe ensuite de façon non covalente sur le conjugué Atg12-Atg5 pour former un complexe Atg12-Atg5-Atg16L agissant comme une ligase et permettant la liaison de la microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3 aussi appelé LC3/Atg8) aux membranes pré-autophagosomales (Mizushima et al., 2003) (**Figure 11**). Le second système « ubiquitin-like » conduit à la formation d'un conjugué lipidique constitué de la phosphatidyléthanolamine (PE) et de LC3. La protéine pro-LC3, précurseur de LC3, est clivée au niveau du COOH terminal par la protéase Atg4B donnant ainsi la forme cytosolique LC3-I. LC3-I se conjugue ensuite à la PE grâce à l'action successive de Atg7 (E1-like enzyme) et Atg3 (E2-like enzyme) pour aboutir à la forme LC3-II associée à la membrane des autophagosomes (Tanida et al., 2001, Tanida et al., 2002) (**Figure 11**). LC3-II est une cible spécifique de l'élongation de la membrane des autophagosomes et, contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16L, reste sur les autophagosomes même après la fusion avec les lysosomes. L'association stable et spécifique de LC3-II aux autophagosomes fait de lui un excellent marqueur lors de l'étude de l'autophagie (Mizushima, 2004, Klionsky, 2012).

La mise au point de modèles animaux déficients pour le gène *Atg5* ou *Atg7* ainsi que l'utilisation de siRNA dirigés contre ces gènes permettent également d'étudier le rôle de l'autophagie dans divers contextes (**Table 1**).

C. Maturation et fusion

Une fois formés dans le cytoplasme, les autophagosomes doivent rejoindre les lysosomes avec lesquels ils vont fusionner. Les autophagosomes se déplacent le long des microtubules, de façon bidirectionnelle, vers le centre organisateur des microtubules (MicroTubule-Organizing Center [MTOC]), une zone riche en lysosomes (Jahreiss et al.,

Génotype	Tissu ou cellule cible	Phénotype	Référence
Atg5 ^{-/-}	Cellules dendritiques	Développement normal des cellules dendritiques mais altération de la délivrance des peptides via l'autophagie aux Toll-like receptors et de la production d'interféron lors d'infection virale.	(Lee et al., 2007)
Atg5 ^{fl/fl} :Podocin-Cre	Podocytes	Glomérulopathie au cours du vieillissement. Accumulation de complexes p62-ubiquitine.	(Hartleben et al., 2010)
Atg5 ^{fl/fl} :CD19-Cre	Lymphocytes B	Diminution du nombre de LB.	(Miller et al., 2008)
Atg5 ^{fl/fl} :MerCreMer-Cre	Cardiomyocytes	Hypertrophie cardiaque, dilatation du ventricule gauche et dysfonction systolique. Accumulation de complexes p62-ubiquitine.	(Nakai et al., 2007)
Atg5 ^{fl/fl} :HSA-Cre	Muscle squelettique	Atrophie des fibres musculaires rapides. Accumulation de complexes p62-ubiquitine.	(Raben et al., 2008)
Atg7 ^{fl/fl} :MLCf-Cre	Muscle squelettique	Atrophie musculaire et diminution de la force musculaire avec l'âge. Accumulation de complexes p62-ubiquitine.	(Masiero et al., 2009)
Atg7 ^{fl/fl} :Rip-Cre	Cellules β-pancréatiques	Dégénérescence des îlots et apparition d'une intolérance au glucose accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline.	(Ebato et al., 2008, Jung et al., 2008)
Atg5 ^{-/-} , Atg7 ^{-/-}	Animal entier	Mort de l'animal dans les 24h après la naissance.	(Kuma et al., 2004, Komatsu et al., 2005)
Atg5 ^{fl/fl} :nestin-Cre ; Atg7 ^{fl/fl} :nestin-Cre	Neurones	Neurodégénérescence. Accumulation de complexes p62-ubiquitine.	(Hara et al., 2006, Komatsu et al., 2006)
Atg5 ^{fl/fl} :Pep2-Cre ; Atg7 ^{fl/fl} :Pep2-Cre	Cellules de Purkinje	Accumulation de structures membranueuses concentriques dans les axones et dégénérescence des axones.	(Komatsu et al., 2007b, Nishiyama et al., 2007)
Atg5 ^{fl/fl} :Lck-Cre ; Atg7 ^{fl/fl} :Lck-Cre	Lymphocytes T	Diminution du nombre de LT. Déséquilibre de l'expression des protéines pro- et antiapoptotiques.	(Pua et al., 2007, Pua et al., 2009, Stephenson et al., 2009)
Atg5 ^{fl/fl} :Mx1-Cre ; Atg7 ^{fl/fl} :Mx1-Cre ; Atg7 ^{fl/fl} :Alb-Cre	Foie	Lésions hépatiques. Accumulation de complexes p62-ubiquitine et dégénérescence mitochondriale.	(Hara et al., 2006, Komatsu et al., 2007a, Komatsu et al., 2005)
Atg6/Beclin-1 ^{-/-}	Animal entier	Anomalie de développement et mort <i>in utero</i> .	(Yue et al., 2003, Qu et al., 2007)
FIP200 ^{-/-}	Animal entier	Mort embryonnaire en fin de gestation associée à une insuffisance cardiaque et une dégénérescence hépatique.	(Gan et al., 2006)

Table 1 : Conséquences phénotypiques des souris mutées pour un gène de l'autophagie.

2008). Ce transport vers le MTOC nécessite l'intervention de protéines motrices appelées dynéines (Kimura et al., 2008b). La dépolymérisation des microtubules ou l'inhibition du transport dépendant de la dynéine peut donc altérer le processus autophagique.

Les autophagosomes fusionnent d'abord avec les endosomes précoces puis tardifs pour former des amphisomes, nécessitant l'intervention des protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Rusten and Stenmark, 2009), puis avec les lysosomes, grâce notamment aux protéines de la famille SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor), pour former les autolysosomes (Stroupe, 2011).

L'étude du flux autophagique passe aussi par l'utilisation d'inhibiteurs de fusion des autophagosomes avec les lysosomes. La bafilomycine A₁, par exemple, en inhibant la V-ATPase (Vacuolar-type H⁺-ATPase), entraîne une augmentation du pH dans les lysosomes et inhibe la fusion des autophagosomes-lysosomes (Yamamoto et al., 1998). La chloroquine, quant à elle, est un agent lysosomotropique qui s'accumule dans les compartiments acides, augmente le pH en neutralisant les protons et inhibe la fusion des autophagosomes et des lysosomes et donc l'autophagie (Yoon et al., 2010). L'intégrité du contenu lysosomal est donc essentielle pour une fusion optimale.

D. Dégradation lysosomale

Les enzymes lysosomales, dont les hydrolases, situées à la surface interne des lysosomes dégradent le matériel séquestré puis la membrane des autolysosomes ce qui permet la libération, dans le cytosol, d'acides aminés qui seront recyclés pour la synthèse de macromolécules et la production d'énergie.

Le flux autophagique peut aussi être étudié à ce niveau en utilisant des inhibiteurs de protéases lysosomales, tels que la Pepstatine A souvent associée à l'E-64, qui empêchent l'activité des hydrolases et la dégradation des organites et macromolécules séquestrés (Klionsky, 2012).

E. Sélectivité de la dégradation lysosomale

Il a longtemps été considéré que l'autophagie était un processus de dégradation non sélectif mais cela a été rediscuté depuis l'identification de la protéine p62, aussi appelée

sequestosome 1 (SQSTM1). Cette protéine possède plusieurs domaines lui permettant de se lier, à la fois, à l'ubiquitine, elle-même fixée à des agrégats protéiques ou des organites à dégrader, et aux autophagosomes via la protéine LC3 (**Figure 12**) (Pankiv et al., 2007). Le complexe p62-ubiquitine-agrégats est ainsi dégradé par les autolysosomes. La protéine p62 assure donc l'agrégation et l'élimination de protéines pouvant être délétères. Lors d'un déficit en autophagie, p62 et les agrégats s'accumulent dans les cellules, ce qui entraîne un stress oxydatif qui pourrait être à l'origine de modifications pathologiques dans le foie des souris dont le gène *Atg7* est déficient (Komatsu et al., 2007a).

La mise en évidence d'un nouveau groupe de récepteurs dans le cytoplasme, les SLRs ((p62/SQSTM1)-Like Receptors), tend à renforcer l'idée que l'autophagie est un processus sélectif. En effet, les SLRs sont des protéines adaptatrices autophagiques reconnaissant des cibles ubiquitinées et la protéine LC3 grâce à leur région LIR (LC3 Interacting Region). Parmi ces récepteurs, NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1) peut fixer l'ubiquitine par l'intermédiaire de son domaine UBA (UBiquitin-Associated domain) et LC3 via son domaine LIR et peut être dégradée par l'autophagie sous la dépendance de LIR (Kirkin et al., 2009). La protéine NDP52 (Nuclear Dot Protein 52 kD), appartenant également à la famille des SLRs, et l'optineurin joueraient un rôle dans l'immunité innée en liant, d'une part, les protéines polyubiquitinées qui se fixent sur certaines bactéries comme *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium, et d'autre part, la protéine LC3 (Thurston et al., 2009, Wild et al., 2011). NDP52 et l'optineurin permettent ainsi la séquestration puis la dégradation sélective de cette bactérie par le processus autophagique.

III. Régulation de l'autophagie

L'autophagie fait intervenir de multiples acteurs moléculaires rendant sa régulation complexe. En effet, de nombreuses voies de signalisation interagissent avec le processus autophagique et le régulent à différents niveaux : élongation du phagophore, formation de l'autophagosome et fusion autophagosome-lysosome.

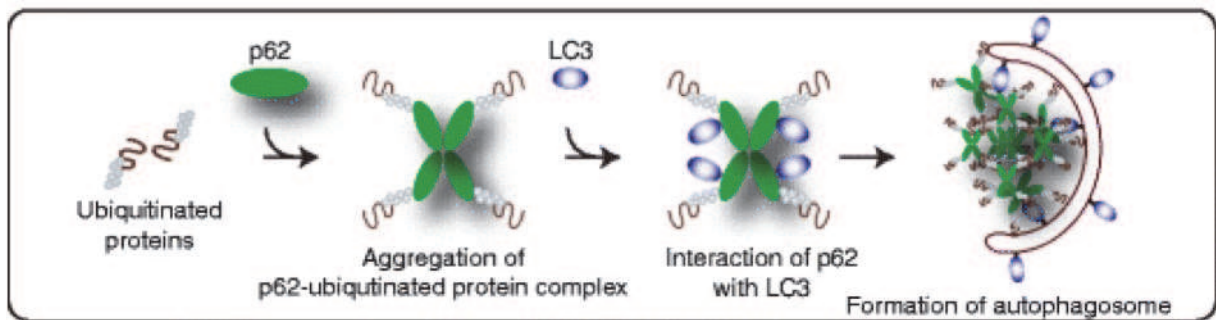


Figure 12 : p62, un récepteur des protéines ubiquitinées.

Les protéines poly-ubiquitinées qui seront dégradées interagissent avec le domaine UBA de la protéine p62. Le complexe ainsi formé sera séquestré dans l'autophagosome grâce à la liaison entre le domaine LIR/LRS de p62 et LC3.

LIR : LC3-Interacting Region ; LRS : LC3 Recognition Sequence ; UBA : UBiquitin-Associated domain.

D'après (Ichimura and Komatsu, 2010).

A. La voie MTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin)

La protéine MTOR, précédemment connue sous le nom de mammalian Target of Rapamycin, est maintenant appelée Mechanistic Target of Rapamycin.

La voie MTOR, principale voie régulant l'autophagie, est aussi la voie la plus étudiée. Elle est composée de deux complexes MTORC1 et MTORC2, eux-mêmes constitués de la protéine kinase MTOR. MTOR, orthologue de mammifère de la protéine kinase TOR chez les levures, joue un rôle dans diverses fonctions cellulaires en plus de l'autophagie, comme l'initiation de la traduction des ARNm (Mamane et al., 2006), la croissance et la prolifération cellulaires (Murakami et al., 2004), la biogenèse des ribosomes (Mayer and Grummt, 2006) ou la ré-organisation du cytosquelette (Jacinto et al., 2004).

Au niveau cellulaire, MTORC1 est régulée par la quantité de nutriments présents. Lorsque l'environnement est riche en nutriments, en particulier en acides aminés et en facteurs de croissance, MTOR est activé et empêche la formation du complexe ULK1/2-Atg13-FIP200 par phosphorylation de ULK1/2 et Atg13 inhibant ainsi l'autophagie à l'étape d'élongation du phagophore. Seuls certains acides aminés sont impliqués dans l'inhibition de l'autophagie par l'intermédiaire de la voie MTOR. L'alanine, la leucine, la glutamine et la phénylalanine semblent être de puissants inhibiteurs de l'autophagie (Periyasamy-Thandavan et al., 2009). Des études ont montrées que les acides aminés, et en particulier la leucine, pourraient induire les PI3K de classe III mais également les PI3K associées à Beclin-1 sans affecter la liaison entre ces deux derniers, entraînant ainsi l'activation de MTOR (Meijer and Codogno, 2009). A l'inverse, en cas de carence en acides aminés, MTOR est inactivé et le processus autophagique peut être induit.

L'autophagie peut également être activée par la rapamycine, un inhibiteur connu de MTOR, indépendamment de la concentration en acides aminés. La rapamycine se lie au récepteur intracellulaire FKBP12 formant ainsi un complexe rapamycine-FKBP12 qui se fixe sur le domaine FKBP12-Rapamycine Binding de MTOR et inhibe l'activité kinase de MTOR (Huang and Houghton, 2001).

Le complexe MTORC2, constitué de MTOR, Rictor (rapamycin-sensitive companion of MTOR), mLST8 et SIN1 (SAPK-interacting protein 1), a un rôle encore mal défini dans la régulation de l'autophagie. Son induction pourrait inhiber indirectement l'autophagie via l'activation de la voie Akt suivie de la phosphorylation inhibitrice de FoxO3, un facteur de

transcription régulant l'expression des gènes pro-autophagiques comme LC3 et Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3) (Mammucari et al., 2007).

B. Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

Les protéines de la famille Bcl-2 sont susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'autophagie car elles peuvent interagir avec la protéine Beclin-1 impliquée dans l'initiation de l'autophagie. En effet, Beclin-1 peut s'associer à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et à ses homologues Bcl-X_L et Bcl-w grâce à son domaine BH3 (Bcl-2 homology 3), entraînant l'inactivité de Beclin-1 et l'inhibition de l'autophagie (Maiuri et al., 2007a) (**Figure 13**). La dissociation du complexe Beclin-1/Bcl-2 conduirait alors à la libération de Beclin-1, ce qui permettrait la formation du complexe PI3K de classe III et la stimulation de l'autophagie. Cette dissociation peut avoir lieu de différentes façons. Des protéines telles que la protéine pro-apoptotique Bad (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter) ou la protéine Bnip3 possédant également un domaine BH3, peuvent entrer en compétition avec Beclin-1 et la déplacer de son complexe (Meijer and Codogno, 2009, Sinha and Levine, 2008). Des études ont montré que l'activation de JNK1, notamment en cas de carence en nutriments, peut entraîner la phosphorylation de plusieurs sites au niveau du domaine BH3 de la protéine Bcl-2 et conduire à la dissociation de Beclin-1 et Bcl-2 (Wei et al., 2008). D'autres travaux ont démontré que le suppresseur de tumeur DAPK (Death-Associated Protein Kinase), une protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante dont l'expression est largement diminuée voire nulle dans de nombreuses tumeurs malignes, peut phosphoryler le domaine BH3 de Beclin-1 et induire sa dissociation de Bcl-2 (Zalckvar et al., 2009).

L'hypoxie peut activer l'autophagie en agissant sur l'interaction Beclin-1/Bcl-2. L'hypoxie stabilise le facteur HIF-1 qui peut ainsi activer Bnip3. Ce dernier déplace le facteur Beclin-1 de Bcl-2 ce qui entraîne l'activation de l'autophagie et la survie cellulaire (Bellot et al., 2009).

C. La protéine Rubicon

La protéine Rubicon (RUN domain and cystein-rich domain containing, Beclin-1-interacting protein) a récemment été identifiée comme une molécule régulant négativement l'autophagie. En se fixant sur Beclin-1 ou sur Vps34, deux protéines constituant le

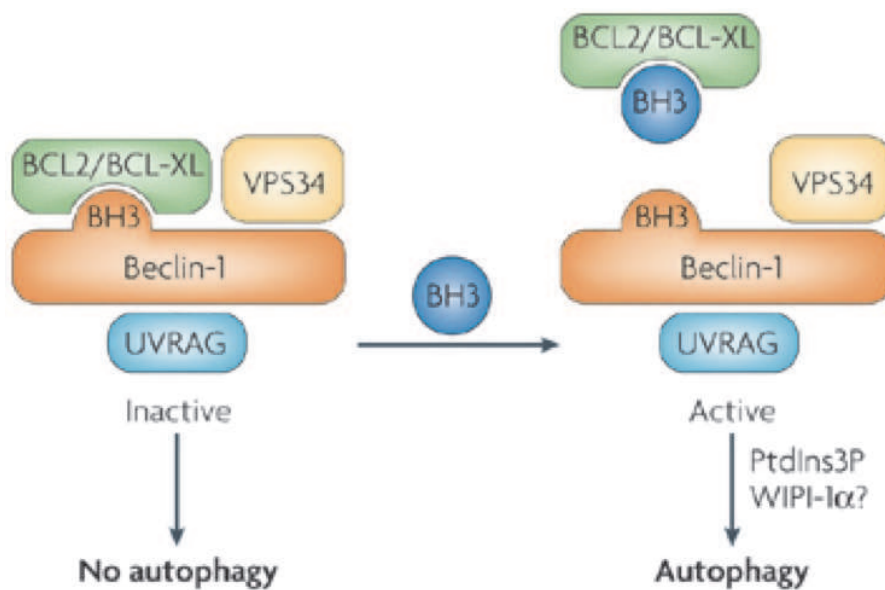


Figure 13 : Protéines à domaine BH3 et interaction Beclin-1/Bcl-2.

La protéine Bcl-2 et ses homologues comme Bcl-X_L peuvent se lier au domaine BH3 de la protéine Beclin-1 entraînant ainsi l'inactivation de Beclin-1 et l'inhibition de l'autophagie. Les protéines possédant un domaine BH3 peuvent entrer en compétition avec Beclin-1 en se liant au domaine récepteur BH3 de la protéine Bcl-2 ou de l'un de ses homologues. Beclin-1 est alors libérée, la protéine Vps34 est activée et l'autophagie peut être initiée. Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 ; BH3 : Bcl-2 Homology 3 ; Vps34 : Vacuolar protein sorting 34.

D'après (Maiuri et al., 2007).

complexe PI3K de classe III, Rubicon peut réduire l'activité kinase de Vps34 et ainsi inhiber l'autophagie (Zhong et al., 2009). Il a été montré que les cellules surexprimant Rubicon contiennent principalement des autophagosomes immatures alors que les cellules ne surexprimant pas cette protéine contiennent des autophagosomes matures (Zhong et al., 2009). A l'inverse, le knockdown du gène *Rubicon* entraîne une augmentation plus importante du nombre d'autolysosomes que d'autophagosomes dans les cellules (Matsunaga et al., 2009). Ces données suggèrent que Rubicon peut bloquer l'autophagie en inhibant la maturation des autophagosomes.

D. L'AMPK (Adenosine Monophosphate-activated protein Kinase)

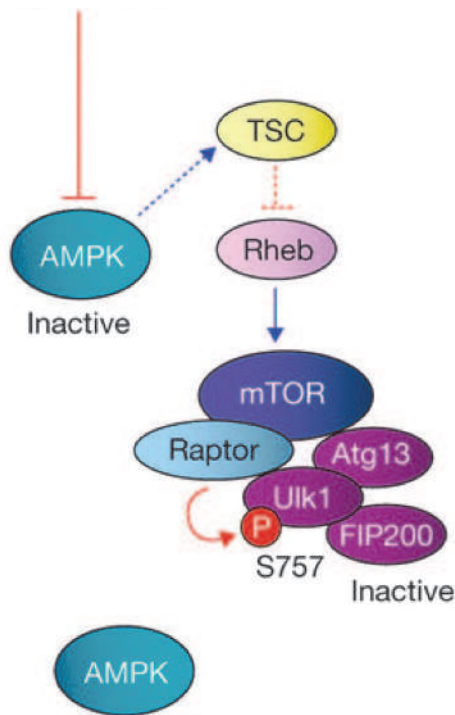
L'AMPK est un régulateur positif de l'autophagie agissant à différents niveaux. L'activité de l'AMPK est sensible aux variations du ratio AMP/ATP cytosolique observées en situation de stress métabolique, par exemple en cas de carence en glucose, lors d'une hypoxie, d'une ischémie ou d'un stress oxydatif (Kahn et al., 2005, Shaw, 2009). L'augmentation de ce ratio, due à une déplétion en ATP, active l'AMPK et entraîne l'activation directe de ULK1, l'inhibition de MTOR par phosphorylation (**Figure 14**) (Kim et al., 2011) et l'activation de TSC2 (Tuberous Sclerosis 2), une protéine suppresseur de tumeur, qui inhibe MTORC1 (Hardie, 2004), ce qui provoque l'induction de l'autophagie.

E. Les kinases eIF2 α

Les kinases eIF2 α sont des protéines phosphorylant le facteur eIF2 α sur la sérine 51, ce qui a pour conséquences l'inhibition de la traduction protéique mais aussi la traduction sélective d'ATF4 et de certains gènes de l'autophagie comme LC3 et Atg5 (Kroemer et al., 2010, Rouschop et al., 2010).

Chez les mammifères, il existe quatre kinases eIF2 α : PERK qui est activée par le stress du RE et l'hypoxie, HRI (Heme-Regulated Inhibitor) activée par une déplétion en hème, PKR (double-stranded RNA-binding Protein Kinase) activée par les virus à ARN double brin, et GCN2 (General Control Non-derepressible-2) activée par les ARN de transfert (ARNt) non chargés en acides aminés. La kinase GCN2 est spécifiquement activée lors d'une carence en acides aminés car la quantité de ces molécules simples, notamment la leucine et le tryptophane, est insuffisante pour charger les ARNt. La

Diminution du ratio AMP/ATP par :
 - fort taux de glucose
 - ...



Augmentation du ratio AMP/ATP par :

- faible taux de glucose
- hypoxie
- ischémie
- stress oxydant
- ...

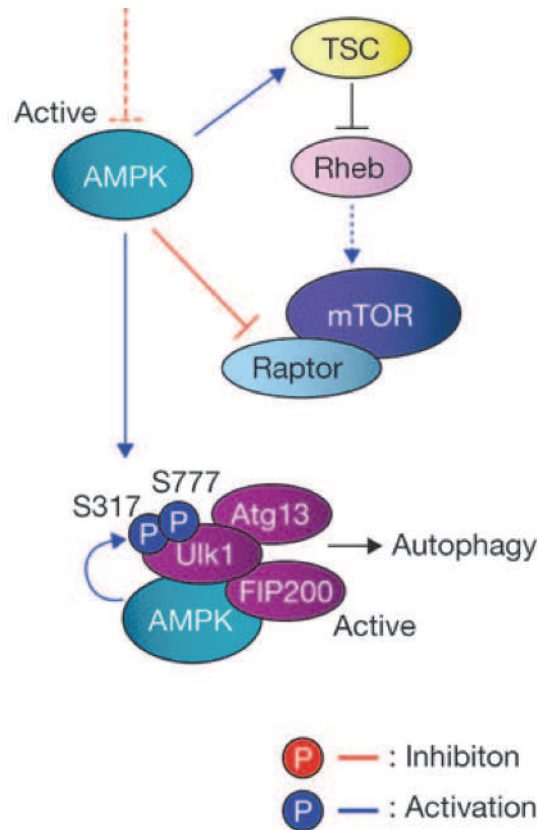


Figure 14 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK.

A gauche : Lorsque le ratio AMP/ATP est faible, l'AMPK est inactive et le complexe MTORC1 est actif. Ce dernier phosphoryle ULK1 sur la sérine 757 ce qui empêche l'interaction ULK1-AMPK et l'activation de l'AMPK. A droite : Lorsque le niveau d'énergie est limité dans la cellule (caractérisé par une diminution de l'ATP), l'AMPK est activée et inhibe le complexe MTORC1 après phosphorylation de TSC2 et Raptor. De plus, la phosphorylation inhibitrice de la Sérine 757 est diminuée ce qui permet l'interaction entre ULK1 et l'AMPK. Cette dernière entraîne deux phosphorylations activatrices sur les Sérines 317 et 777 de ULK1 permettant l'initiation de l'autophagie.

AMPK : AMP-activated protein Kinase ; MTORC1 : mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 ; TS2 : Tuberous Sclerosis 2 ; ULK : UNC-51-like Kinase.

D'après (Kim et al., 2011).

phosphorylation de eIF2 α , et par extension l'activation des kinases eIF2 α , semblent jouer un rôle majeur dans la régulation de l'autophagie puisque les cellules possédant une protéine eIF2 α mutée non phosphorylable, n'induisent pas d'autophagie en réponse à une carence (Talloczy et al., 2002).

IV. L'autophagie : un processus de survie ou de mort cellulaire ?

Le rôle de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire est un sujet complexe et très controversé. Il est bien établi que l'autophagie constitue un mécanisme adaptatif aux stress environnementaux grâce à son activité de recyclage des constituants cellulaires permettant de répondre aux besoins bioénergétiques et de maintenir le métabolisme essentiel à la survie des cellules, alors que le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire est encore très discuté. La mort autophagique a longtemps été décrite comme un type de mort cellulaire en raison de la présence de nombreux autophagosomes dans les cellules mourantes. Cette définition n'est pas complètement vraie car elle n'est fondée que sur des critères morphologiques et ne prend pas en compte la cause de l'accumulation des autophagosomes dans le processus de mort cellulaire. Cette accumulation pourrait être due à une inhibition de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes plutôt qu'à une augmentation du flux autophagique. Elle pourrait également témoigner d'un échec de l'adaptation des cellules à un stress (Shen and Codogno, 2011).

Jusqu'à aujourd'hui, la mort cellulaire autophagique et son intérêt en physiologie du développement ont principalement été décrits chez les eucaryotes inférieurs et les invertébrés comme *Drosophila melanogaster*. Il a été montré que la mutation des gènes *Atg2* et *Atg18* et le knockdown des gènes *Atg1* et *Atg18* retardent significativement la disparition de l'intestin moyen indépendamment de l'activation des caspases, suggérant que l'autophagie agit comme un mécanisme de mort cellulaire dans le développement de la Drosophile (Denton et al., 2009). Chez les mammifères, il n'existe aucune donnée montrant l'implication de la mort autophagique dans des situations physiologiques. La plupart des expérimentations mettant en évidence ce type de mort sont effectuées *in vitro* sur des cultures cellulaires, notamment sur des cellules dont la machinerie apoptotique est défectueuse, et sont peu nombreuses. Par exemple, Shizuma et al. ont montré dans un modèle de fibroblastes embryonnaires murins double knockout pour les gènes pro-

apoptotiques Bax et Bak, qu'un stimulus apoptotique provoqué par l'étoposide entraîne la mort autophagique des cellules et non la mort par apoptose (Shimizu et al., 2004).

Cependant, le nombre de molécules induisant une mort autophagique des cellules humaines est très faible. Un criblage d'environ 1400 agents anticancéreux a été effectué dans le but de savoir si ces molécules induisent leurs effets cytotoxiques via l'autophagie. Parmi ces 1400 composés, environ 80 ont engendré l'accumulation cytoplasmique de GFP-LC3 (Green Fluorescent Protein couplée à LC3) caractérisant une accumulation d'autophagosomes. Sur les 80 molécules restantes, 59 ont induit un flux autophagique mais aucune d'entre elles n'a entraîné la mort des cellules via l'induction de l'autophagie ce qui souligne le fait que la mort cellulaire est rarement réalisée par l'autophagie dans les cellules humaines (Shen et al., 2011).

Bien que peu observée, l'autophagie pourrait agir comme un mécanisme de mort cellulaire qui dépend de l'espèce, du type cellulaire et de la nature du stimulus. Son mécanisme est cependant mal connu et différentes hypothèses ont été avancées. Le premier mécanisme repose sur le fait qu'un excès d'autophagie, provoqué par un stress prolongé, peut conduire à un déséquilibre entre la stimulation de l'autophagie et la capacité des cellules à dégrader complètement les constituants cellulaires, ce qui empêche la bonne restitution des composants essentiels aux cellules. La seconde hypothèse est fondée sur les cibles du processus autophagique. L'autophagie pourrait, par erreur, digérer des organites vitaux ou des protéines essentielles à la viabilité cellulaire. Le troisième mécanisme serait lié à un excès d'autophagie qui éliminerait une trop grande quantité de cytoplasme et entraînerait alors une mort cellulaire atrophique par autodigestion (Periyasamy-Thandavan et al., 2009). C'est le cas par exemple lorsque la protéine Beclin-1 est surexprimée. L'autophagie est suractivée et une dégradation non spécifique de grande quantité de constituants cytoplasmiques entraîne la mort cellulaire (Pattingre et al., 2005).

En prenant en compte les éléments morphologiques et la cause de l'induction de l'autophagie, la description de la mort cellulaire doit répondre aux trois critères suivants pour être définie comme une mort autophagique : (1) la mort cellulaire doit survenir sans l'implication de la machinerie apoptotique, comme l'activation des caspases ; (2) le flux autophagique, et pas seulement les marqueurs autophagiques, doit être augmenté dans les cellules mourantes ; (3) l'inhibition de l'autophagie par des inhibiteurs pharmacologiques

ou via des approches génétiques (comme les ARN interférences dirigés contre les *Atg*) doit améliorer la survie cellulaire ou prévenir la mort cellulaire (Shen and Codogno, 2011).

V. L'autophagie en pathologie humaine

L'autophagie basale est un processus important dans la physiologie d'un grand nombre d'organes. Elle intervient également au cours du vieillissement pour maintenir une activité cellulaire normale. L'équilibre de ce processus dans les cellules est fondamental. En effet, l'inhibition de l'autophagie basale permettant un contrôle qualité intracellulaire, mais aussi l'activation excessive de l'autophagie sont délétères et entraînent le développement notamment de pathologies neurodégénératives, cancéreuses ou rénales. L'autophagie pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante.

A. Autophagie et maladies neurodégénératives

L'autophagie basale, primordiale au maintien de l'homéostasie cellulaire, semble avoir une fonction protectrice au cours des neuropathies dégénératives. En effet, des souris knockout pour les gènes *Atg5* ou *Atg7* spécifiquement dans les cellules neuronales, montrent une dégénérescence neuronale sévère, un déficit de la fonction motrice et accumulent des agrégats protéiques polyubiquitinés dans le cytoplasme (Komatsu et al., 2006, Hara et al., 2006). De plus, l'autophagie intervient dans la protection des cellules neuronales, en complément du système ubiquitine-protéasome, en dégradant les agrégats protéiques cytosoliques constitués de protéines mutées retrouvées dans plusieurs maladies neurodégénératives, notamment la huntingtine mutée due à une expansion de polyglutamine dans la maladie de Huntington (Ravikumar et al., 2004), la protéine tau mutée dans la maladie d'Alzheimer (Kruger et al., 2011), et l' α -synucléine mutée dans la maladie de Parkinson (Lynch-Day et al., 2012). Cependant, le processus d'autophagie peut être submergé à cause d'une accumulation trop importante de ces protéines mutées. Dans la maladie d'Alzheimer, des autophagosomes s'accumulent dans les neurones atteints suggérant que la fusion autophagosomes-lysosomes ne se fait plus et que l'autophagie n'est plus efficace (Meijer and Codogno, 2009). L'autophagie peut donc être une cible thérapeutique très intéressante dans le traitement des maladies neurodégénératives. La

stimulation de ce processus protecteur dans les neurones défectueux pourrait favoriser l'élimination des agrégats protéiques qui s'accumulent dans le cytoplasme. L'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de MTOR et donc un activateur de l'autophagie, et d'un analogue de la rapamycine, respectivement dans un modèle murin de maladie de Huntington et dans un modèle de mouche, ont permis de réduire l'accumulation d'agrégats protéiques insolubles et donc d'améliorer la survie des neurones en réduisant la dégénérescence de ces cellules (Ravikumar et al., 2004).

B. Autophagie et cancer

La littérature existante concernant le rôle de l'autophagie dans les pathologies cancéreuses sont nombreuses et complexes. La tumorigenèse et l'autophagie sont deux phénomènes dont les voies de régulation sont très intriquées. La majorité des données montrent qu'il y a une forte corrélation entre les molécules impliquées dans l'induction de l'autophagie et la suppression tumorale et entre les molécules intervenant dans l'inhibition de l'autophagie et l'oncogenèse. En effet, plusieurs gènes suppresseurs de tumeur tels que PTEN, TSC1, TSC2 et p53, interviennent dans l'inhibition de la voie MTOR et stimulent l'autophagie. Inversement, des oncogènes tels que les PI3K de classe I et Akt activant MTOR, et Bcl-2 inhibent l'autophagie (Levine and Kroemer, 2008).

L'un des premiers travaux qui a mis en évidence l'implication des gènes de l'autophagie dans la suppression tumorale a été réalisé par Liang et al.. Il a été montré que, dans un pourcentage élevé de cancers humains du sein, des ovaires et de la prostate, l'expression du gène *Beclin-1* est monoallélique et que l'expression de la protéine Beclin-1 est diminuée dans des tumeurs humaines du sein, des ovaires et du cerveau (Liang et al., 1999). De plus, l'haploinsuffisance du gène *Beclin-1* favorise la tumorigenèse dans divers tissus de souris transgéniques (Qu et al., 2003).

La croissance tumorale peut être inhibée par une induction de l'autophagie (White, 2012). Cependant, l'autophagie peut avoir une fonction de survie pour les cellules tumorales. C'est le cas notamment pendant le stade précoce de la croissance de certaines tumeurs solides, lorsque l'insuffisance de la vascularisation des cellules tumorales limite l'apport en nutriments et en oxygène (Levine, 2007). Le mécanisme qui induit l'autophagie dans ces conditions n'est pas connu mais pourrait faire intervenir l'activation de l'AMPK et de HIF-1 (Meijer and Codogno, 2009).

p62, une protéine impliquée dans l'autophagie, joue également un rôle dans la tumorigenèse. Le niveau d'expression de l'ARNm de p62 et l'expression protéique de p62 sont augmentés, respectivement, dans des tumeurs pulmonaires et dans des cellules murines transformées avec une oncoprotéine (Nezis and Stenmark, 2012). Néanmoins, p62 semble également agir comme un suppresseur de tumeur en contrôlant la mort cellulaire et le cycle cellulaire (Nezis and Stenmark, 2012).

L'autophagie pourrait donc, à la fois, inhiber l'initiation du processus cancéreux en éliminant les substrats protéiques oncogènes, les protéines mal conformées toxiques et les organites endommagés comme certaines mitochondries, et favoriser la croissance d'un cancer déjà établi en recyclant les composants intracellulaires afin de fournir des substrats pour le métabolisme et le maintien des fonctions cellulaires, et ainsi améliorer la survie cellulaire (White, 2012). La mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales ciblant l'autophagie est donc délicate car l'induction de ce processus peut avoir des conséquences opposées sur la survie des cellules cancéreuses.

C. Autophagie et pathologies rénales

L'implication du processus autophagique en physiologie rénale est assez peu étudiée et elle commence simplement à émerger en pathologie rénale. Huber *et al.* ont récemment recensé les dernières données concernant le rôle de l'autophagie dans le développement de pathologies rénales, notamment glomérulaires et tubulaires (Huber et al., 2012).

Premièrement, les podocytes, qui sont des cellules épithéliales viscérales composant une partie du glomérule, jouent un rôle essentiel dans le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. Ce sont des cellules hautement différenciées ayant une capacité de prolifération limitée. Les lésions podocytaires peuvent entraîner des glomérulopathies. Elles vont produire une glomérulosclérose, qui est, à terme, associée à une insuffisance rénale terminale. La survie des podocytes dépend donc de leur capacité à faire face au stress. L'autophagie pourrait jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie et des fonctions de ces cellules. Il a été mis en évidence dans des modèles de souris transgéniques exprimant la GFP-LC3, que de nombreux autophagosomes étaient présents dans les podocytes à un niveau basal, ce qui suggère une importante activité autophagique dans ces cellules (Hartleben et al., 2010). D'autres travaux ont montré qu'une délétion du

gène *Atg5* dans les podocytes entraîne une accumulation de mitochondries endommagées et d'agrégats protéiques ubiquitinés signifiant que l'élimination des produits à dégrader dépend de l'autophagie (Hartleben et al., 2010). De plus, dans ces mêmes modèles expérimentaux animaux d'inactivation de l'autophagie dans lesquels une glomérulonéphrite, se caractérisant par une protéinurie, a été induite, l'autophagie semble jouer un rôle protecteur et anti-protéinurique (Hartleben et al., 2010).

Deuxièmement, les cellules tubulaires proximales rénales sont impliquées dans le processus de réabsorption des électrolytes. Ces cellules consomment une grande quantité d'énergie fournie par les mitochondries pour la réabsorption mais également pour la dégradation de protéines telles que l'albumine et les protéines plasmatiques de bas poids moléculaire. Le maintien de l'homéostasie mitochondriale est donc primordial à leur bon fonctionnement et se fait notamment par l'autophagie. En effet, dans un modèle de souris spécifiquement déficientes pour le gène *Atg5* dans les cellules tubulaires rénales, il a été observé une accumulation massive de mitochondries endommagées et d'agrégats protéiques entraînant une hypertrophie des tubules proximaux voire une destruction des cellules qui n'est pas retrouvée chez les souris wild-type (Kimura et al., 2011). L'élimination de ces organites et macromolécules empêche la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale et par conséquent inhibe l'apoptose, et évite la production d'ERO (Isaka et al., 2011). Les tubules rénaux sont la cible d'agressions ischémiques et toxiques. Il a été montré que les lésions dues à l'IR sont plus sévères chez les souris déficientes en autophagie que chez les souris wild-type suggérant le rôle protecteur de l'autophagie vis-à-vis des agressions ischémiques (Jiang et al., 2010). De même, Periyasamy-Thandavan et *al.* ont mis en évidence, dans un modèle de cellules tubulaires proximales rénales et Takahashi et *al.*, dans un modèle de souris transgéniques déficientes pour le gène *Atg5*, que l'autophagie permet d'améliorer la survie cellulaire lors d'une exposition au cisplatine, une molécule utilisée dans les traitements anti-cancéreux et induisant une insuffisance rénale aiguë (Periyasamy-Thandavan et al., 2008, Takahashi et al., 2012).

Au sein du laboratoire, il a été montré, au cours des dernières années, que l'autophagie protège les cellules tubulaires rénales humaines de la toxicité induite par la CsA, un puissant immunosuppresseur utilisé en transplantation. Il a aussi été mis en évidence que le

stress du RE, induit par la CsA, active l'autophagie et que cette dernière participerait à la protection contre le stress du RE et à la survie cellulaire (Pallet et al., 2008b).

L'autophagie joue donc un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du parenchyme rénal dans des conditions physiologiques (Weide and Huber, 2011) mais son implication en pathologie rénale n'est pas encore totalement caractérisée. Une meilleure connaissance du rôle de l'autophagie en néphrologie, et plus précisément dans l'évolution de la néphropathie d'allogreffe, est nécessaire, compte tenu des perspectives thérapeutiques possibles.

VI. Autophagie, infections, immunité et inflammation

A. Autophagie et infections

L'autophagie est un processus qui contribue non seulement au maintien de l'homéostasie cellulaire mais qui permet également de lutter contre les infections bactériennes, parasitaires et virales. L'autophagie entraîne la dégradation, via les lysosomes, des pathogènes intracellulaires séquestrés dans les autophagosomes. Ce phénomène, appelé xénophagie, a été observé dans des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose (Gutierrez et al., 2004), dans des macrophages activés infectés par *Toxoplasma gondii* (Ling et al., 2006) ainsi que dans des fibroblastes embryonnaires murins infectés par l'Herpes Simplex Virus de type 1 (Talloczy et al., 2006, Pei et al., 2011). L'identification précise des mécanismes autophagiques dans la défense des cellules contre les agents infectieux est donc importante pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours des maladies infectieuses. Cependant, les pathogènes intracellulaires qui sont continuellement confrontés à la machinerie enzymatique cellulaire évoluent avec l'hôte et les espèces possédant les molécules leur permettant de survivre pourront s'adapter et échapper à la machinerie de l'hôte. Certains pathogènes peuvent développer des mécanismes d'évitement en produisant ou en recrutant, par exemple, des molécules qui vont masquer les sites d'adressage qui ne seront donc plus reconnus par l'ubiquitine et ne seront plus dirigés vers la voie de dégradation autophagique dépendante de p62. D'autres pathogènes peuvent également contourner l'autophagie en

inhibant l'étape d'initiation de ce processus, en interagissant avec Beclin-1 par exemple, en inhibant la maturation des autophagosomes ou en empêchant la fusion des autophagosomes et des lysosomes (Joubert et al., 2011, Deretic and Levine, 2009). Enfin, certains agents pathogènes peuvent mettre à profit l'autophagie en l'utilisant pour assurer leur prolifération. C'est le cas notamment du virus de l'hépatite C qui se sert des protéines Beclin-1 et Atg7 pour initier sa réplication voire même pour assembler ses particules virales (Dreux and Chisari, 2011).

B. Autophagie et immunité

L'autophagie participe également à la régulation de l'immunité innée et adaptative. Lors d'une infection, les cellules hôtes détectent des composants d'origine virale, bactérienne ou parasitaire appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par l'intermédiaire de récepteurs de l'immunité innée connus sous le nom de PRR (Pattern Recognition Receptor). Parmi ces PRR, on retrouve la PKR qui reconnaît les ARN viraux double brin puis phosphoryle le facteur eIF2 α (Garcia et al., 2006), les NLRs (NOD-like Receptors) qui lient les ligands bactériens (Deretic, 2011), les RLRs (RIG-I-like Receptors) qui reconnaissent les ARN viraux simple brin (Yoneyama and Fujita, 2007) et les récepteurs de la famille des TLR qui sont aussi activés par les DAMPs (Essakalli et al., 2009). L'activation des PRR stimule l'autophagie puis l'élimination des agents pathogènes par xénophagie (Sumpter and Levine, 2010). Les autophagosomes semblerait également délivrer les acides nucléiques du virus de la stomatite vésiculaire au récepteur TLR7 ce qui entrainerait l'activation d'une voie de transduction conduisant à la production des interférons de type I (IFN-I), cytokines anti-virales, par les cellules dendritiques plasmacytoïdes infectées (Lee et al., 2007).

L'autophagie joue un rôle important au cours de l'immunité adaptative. Elle induit la production de peptides antigéniques microbiens ou endogènes via les lysosomes et favorise leur prise en charge par les molécules du CMH de classe II (Ravikumar et al., 2010). Il a été montré que l'inhibition, pharmacologique ou génétique, de l'autophagie réduit l'efficacité de la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe II (Levine and Deretic, 2007). Les antigènes sont ensuite présentés, par les cellules présentatrices d'antigène, aux lymphocytes T CD4⁺ qui initient la réponse immune adaptative. L'autophagie pourrait jouer un rôle clé dans les réponses immunes innée et acquise, dans le

contrôle de l'infection mais aussi dans les maladies auto-immunes car elle régule la prise en charge de l'antigène et sa présentation. Ainsi, une inhibition ou une activité trop faible du processus autophagique pourrait diminuer la présentation antigénique ce qui limiterait l'activation de la réponse immune acquise et favoriserait l'apparition de maladies infectieuses. En revanche, une activité trop élevée de l'autophagie pourrait entraîner la présentation non appropriée de molécules endogènes qui seraient reconnues comme étrangères par le système immunitaire et prédisposeraient aux maladies auto-immunes.

La plupart du temps, la présentation de l'antigène se fait par des cellules présentatrices d'antigène professionnelles comme les cellules dendritiques, mais il a été montré que les cellules épithéliales tubulaires de biopsies de patients greffés rénaux présentant un rejet aigu pouvaient également exprimer des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation permettant d'activer les cellules T CD4⁺. De cette manière, les cellules tubulaires rénales participeraient au rejet du greffon (Ngan and Du, 2009).

C. Autophagie et inflammation

La machinerie autophagique joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation. L'autophagie intervient dans la régulation des réponses transcriptionnelles inflammatoires et active notamment le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B lors de l'accumulation de la protéine p62 dans les cellules déficientes en autophagie par un mécanisme impliquant l'oligomérisation de TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) (Mathew et al., 2009). De plus, l'autophagie inhibe l'inflammasome NLRP3, un complexe multiprotéique qui active la caspase-1. Cette dernière entraîne le clivage de la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 et rend l'IL-1 β et l'IL-18 actives (Harris, 2011, Schroder and Tschopp, 2010). Le NLRP3 peut être activé par les ERO produites par les mitochondries endommagées. L'autophagie dégrade ces organites endommagés réduisant l'activation de l'inflammasome et inhibant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (Zhou et al., 2011). L'autophagie peut aussi contrôler la sécrétion de l'IL-1 β en ciblant la pro-IL-1 β et en la dégradant via les lysosomes (Harris et al., 2011). L'autophagie permet également d'éviter le développement d'une réponse inflammatoire en éliminant les corps apoptotiques au cours de la mort cellulaire afin d'empêcher la nécrose et la production de signaux de danger (DAMPs) qui stimulent l'inflammation (Levine et al., 2011).

De même que dans le contexte pathologique, une meilleure compréhension du processus autophagique dans l'immunité et l'inflammation est nécessaire pour élaborer des stratégies thérapeutiques ciblant l'autophagie.

Objectifs et présentation des travaux

Partie 1 : Objectifs de la thèse

Une meilleure compréhension des mécanismes régulant les réponses des cellules du parenchyme rénal à des stress ischémiques et inflammatoires est nécessaire pour améliorer la prise en charge des patients développant une maladie rénale chronique et des patients transplantés rénaux. La mise en évidence de nouvelles voies physiopathologiques devrait permettre le développement de biomarqueurs précoces de souffrance cellulaire et tissulaire mais également l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les processus adaptatifs mis en place par les cellules lors de diverses agressions ont pour but de maintenir l'homéostasie rénale. Ces mêmes mécanismes, bénéfiques pour les cellules, participent également à l'activation d'autres réponses pouvant contribuer à la création d'un microenvironnement délétère.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les mécanismes de régulation et les conséquences microenvironnementales de l'activation de la réponse UPR et de l'autophagie par des stress ischémiques et immunologiques.

Dans la thèse présentée ici, nous avons tout d'abord mis en évidence le rôle de la réponse UPR dans la génération des réponses inflammatoire (**Article 1**) et angiogénique (**Article 2**) induites lors d'une carence en glucose, une des composantes de l'ischémie, dans des cellules épithéliales tubulaires rénales. Nous avons également identifié un nouveau mécanisme par lequel un stress immunologique, l'IFN γ , active l'autophagie et nous avons montré que l'autophagie module la réponse inflammatoire induite par l'IFN γ (**Article 3**).

Des travaux annexes impliquant la réponse UPR dans la physiopathologie des problématiques néphrologiques sont également présentés : mise en évidence de l'implication du stress du RE dans les maladies rénales associées à la mutation de *UMOD* (**Etude 1**) et dans la diminution des récepteurs NKG2D présents à la surface des cellules NK chez les patients diabétiques de type 2 (**Etude 2**).

Partie 2 : Travaux publiés

Article 1 : Le stress métabolique favorise l'inflammation tubulaire rénale en activant la réponse UPR (Unfolded Protein Response).

Fougeray S, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E, Pallet N. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis*, 2: e143, 2011.

L'épithélium rénal joue un rôle majeur dans le développement des lésions rénales structurelles induites par l'ischémie puisqu'il est capable de produire des cytokines inflammatoires et profibrogéniques ainsi que des chimiokines. Les conséquences de l'hypoxie dans la survenue des lésions rénales ont été largement étudiées alors que les effets de la carence en glucose sur le parenchyme rénal sont moins connus. Les cellules tubulaires rénales soumises à l'ischémie activent des voies adaptatives, telle que la réponse UPR, afin de rétablir une fonction normale du RE et donc de maintenir l'homéostasie et la survie cellulaire.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la réponse UPR dans la génération d'une réponse inflammatoire induite par un stress métabolique, caractérisé par une carence en glucose, dans les cellules tubulaires rénales corticales.

Nous avons montré que la carence en glucose, mais pas l'hypoxie ni la carence en acides aminés, induit un stress du RE et active les voies PERK et IRE1 α de la réponse UPR. La carence en glucose active également le facteur de transcription NF- κ B et favorise la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α et RANTES). L'inhibition de *PERK* par l'utilisation de siRNA ne modifie pas la signalisation de NF- κ B ni le profil d'expression des cytokines suggérant que la voie PERK/eIF2 α n'est pas nécessaire à l'activation de l'inflammation. Cependant, le salubrinal, un inhibiteur de la déphosphorylation du facteur eIF2 α , stimule la voie PERK et l'expression de l'IL-6, l'IL-8, MCP-1 et TNF- α lors d'une carence en glucose indiquant que la voie PERK amplifie l'expression des cytokines et servirait de voie accessoire à l'inflammation tubulaire. L'inhibition de *IRE1 α* par des siRNA réduit l'expression des

transcrits des molécules inflammatoires montrant que la voie IRE1 α est impliquée dans la génération de cette réponse inflammatoire. De plus, l'ischémie aiguë active le stress du RE et l'inflammation dans les reins de rat. Enfin, à partir de biopsies de déclantage de greffons rénaux, nous avons mis en évidence une expression significativement plus importante du marqueur de stress du RE, la protéine BiP/GRP78, et de la sous-unité p65/RelA de NF- κ B dans les tubes rénaux, en comparaison avec des biopsies de greffons rénaux stables, à distance de la greffe. L'expression de ces deux protéines est colocalisée dans les tubules rénaux confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro*.

En conclusion, nous avons démontré que le stress métabolique induit un stress du RE et active la réponse UPR, *in vitro* et *in vivo*. De plus, la réponse UPR est impliquée dans la mise en place de la réponse inflammatoire tubulaire qui constitue un microenvironnement qui pourrait contribuer au développement de la réponse immune adaptative. Nous mettons en évidence pour la première fois un lien entre le stress ischémique, l'activation de la voie UPR et la génération d'une réponse inflammatoire tubulaire.

Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response

S Fougeray¹, N Bouvier¹, P Beaune^{1,3}, C Legendre², D Anglicheau^{1,2}, E Thervet^{1,2} and N Pallet^{*,1,2}

The renal epithelium contributes to the development of inflammation during ischemic injury. Ischemia induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates the unfolded protein response (UPR). Ischemic tissues generate distress signals and inflammation that activates fibrogenesis and may promote adaptive immunity. Interestingly, the UPR may activate inflammation pathways. Our aim was to test whether the UPR is activated during metabolic stress and mediates a tubular inflammatory response. Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids deprivation, activated the UPR in human renal cortical tubular cells in culture. This stress activated NF- κ B and promoted the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines, including IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES and MCP-1. The protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase signaling pathway was not required for the induction of inflammation but amplified cytokine. Inositol-requiring enzyme 1 activated NF- κ B signaling and was required for the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines following metabolic stress. Moreover, acute ischemia activated ER stress and inflammation in rat kidneys. Finally, the ER stress marker GRP78 and NF- κ B p65/RelA were coexpressed in human kidney transplants biopsies performed before implantation, suggesting that ER stress activates tubular inflammation in human renal allografts. In conclusion, this study establishes a link between ischemic stress, the activation of the UPR and the generation of a tubular inflammatory response.

Cell Death and Disease (2011) 2, e143; doi:10.1038/cddis.2011.26; published online 14 April 2011

Subject Category: Immunity

Ischemia, the shortage of blood supply into an organ is a common complication of various clinical conditions including cancer, stroke or solid organ transplantation. Renal ischemia is a major cause of acute and end-stage renal failure, which causes serious morbidity and mortality.¹ In the renal transplant setting, ischemic injuries under toxic conditions (calcineurin inhibitors), surgical pressure or immunological injury compromise tissue viability and promote alloimmunity, leading to interstitial fibrosis/tubular atrophy, progressive graft dysfunction and loss.^{2,3} In addition, acute ischemia in native kidneys may trigger autoimmunity through the generation of alarm signals by stressed and/or dying cells and the generation of endogenous neoantigens and epitope spreading.^{4–6}

The renal tubular epithelium has a central role in the development of acute and chronic kidney structural deterioration after ischemic injury, especially by the generation of inflammatory and profibrogenic cytokines.^{7,8} Renal ischemia generates a cascade of proinflammatory mediators that can amplify injury. For example, renal-associated TLRs 2 and 4 recognize danger-associated molecular patterns (DAMPs) and promote local inflammation.^{9,10} Modulation of the graft microenvironment by this early innate response may be a prerequisite for fibrogenesis and for the full development of adaptive immunity and subsequent renal allograft rejection.

The primary mechanism through which the ischemic kidney initiates this inflammatory cascade has not yet been fully elucidated and alternative biological pathways should be tested. Although various extracellular stimuli, including DAMPs, promote tubular inflammation, the implication of intracellular distress processes on tubular inflammation remains to be determined.

Tubular cells that encounter nutrient and oxygen deprivation during ischemia use various adaptive responses to maintain homeostasis and survival, including the inhibition of degradation of hypoxia inducible factor-1 α , the inhibition of mammalian target of rapamycin-dependent signaling and the initiation of macroautophagy and the activation of the unfolded protein response (UPR). These adaptive responses decrease energy expenditure, increase nutrient availability and promote cell survival. However, these biological processes also lead to the generation of proinflammatory cytokines and chemokines, suggesting that stressed tissues generate alarm signals that produce an inflammatory microenvironment in addition to releasing DAMPs.^{11–14} Whether such responses trigger inflammation in the setting of acute renal ischemia is unknown.

Ischemia promotes endoplasmic reticulum (ER) stress, a situation that is caused by the accumulation of misfolded

¹INSERM U775, Université Paris Descartes, Paris, France; ²Service de Transplantation Rénale, Hôpital Necker, Paris, France and ³Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

*Corresponding author: N Pallet, INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères. 45 rue des Saints-Pères, Paris 75006, France. Tel: + 33 14 286 2251; Fax: + 33 14 286 2072; E-mail: nicolas.pallet@nck.aphp.fr

Keywords: inflammation; epithelial cells kidney; ischemia; transplantation; endoplasmic reticulum stress

Abbreviations: ATF, activated transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 α , elongation initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GADD34, growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34; GRP, glucose-related protein; IR, ischemia–reperfusion; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; PERK, protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase; TRAF2, tumor necrosis factor-associated receptor 2; UPR, unfolded protein response; HRCCs, human renal cortical cells; XBP1, X-box-binding protein 1

Received 21.12.10; revised 15.2.11; accepted 11.3.11; Edited by V De Laurenzi

proteins in the lumen of the ER. ATP shortage caused by hypoxia and glucose deprivation decreases the intra-reticular calcium concentration, impairs the activity of chaperone molecules, interferes with disulfide bridge formation and impairs the maturation of native proteins.^{15–17} The function of the UPR is to adjust cell functions in response to ER stress and to re-establish normal ER function both at the translational and transcriptional level. If the stress persists and adaptation fails, the cell activates the apoptotic program.¹¹ In ER stress conditions, the aim of the UPR is to adapt to the changing environment and reestablish normal ER function, by reducing messenger RNA (mRNA) translation and therefore the amount of new synthesized proteins in the ER, by increasing the proteasomal degradation of ER localized proteins, and by increasing the protein folding capacity of the ER. When adaptation fails and ER stress prolongs, cell triggers death programs, usually in the form of apoptosis.¹⁸ Three major mediators are involved in the UPR signaling: activated transcription factor 6 (ATF6), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK).

The aim of this study was to investigate whether renal tubular cells promote inflammation through the UPR in the context of ischemic injury. We have demonstrated that glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage induces ER stress and activates the IRE1 and PERK pathways in human renal cortical cells (HRCCs) in culture. Although the IRE1 axis is necessary for NF- κ B activation and proinflammatory cytokines production, the PERK pathway is not required for NF- κ B activation but amplifies the tubular inflammatory response. Moreover, ER stress and NF- κ B are also activated in rat kidneys following acute cold ischemia. Finally, we have demonstrated that acute kidney ischemic injury promotes tubular ER stress and activates the NF- κ B pathway in human renal allografts.

Results

Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage promote ER stress. We first examined which metabolic constituent of ischemia, namely glucose or amino acids deprivation, or hypoxia, induced ER stress in tubular cells. HRCCs exposed for 24 h to glucose-deprived culture medium expressed the ER stress marker GRP78, also known as binding immunoglobulin protein, whereas cells cultured for 24 h without amino acids, or subjected to hypoxia (Figure 1a, bottom) did not develop ER stress (Figures 1a and c). GRP94, a chaperone involved in the adaptive response to ER stress, was also expressed during glucose deprivation (Figure 1b). These results suggest that glucose deprivation, but not amino acids deprivation or hypoxia, promotes ER stress in HRCCs in culture.

Metabolic stress activates the PERK pathway. As glucose deprivation, hereafter referred to as metabolic stress, promotes tubular ER stress, we next tested whether the UPR was activated. Metabolic stress activated the PERK pathway, as shown by the early phosphorylation of the translation initiator elongation initiation factor 2 α (eIF2 α ;

Figure 2a), followed by the selectively translated transcriptional factor ATF4 (Figure 2b) and the expression of transcripts for the apoptotic inducers C/EBP homologous protein (CHOP; also known as growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153)) and GADD34 (Figure 2c). These results suggest that metabolic stress activates the PERK pathway in HRCCs.

Metabolic stress activates the IRE1 pathway. IRE1 homodimerizes during ER stress and acquires kinase and endonuclease activities. In HRCCs subjected to metabolic stress, the transcriptional factor X-box-binding protein 1 (XBP1) was actively spliced during glucose deprivation (Figure 2d), suggesting that IRE1 is activated during metabolic stress. Together, these results indicate that metabolic stress activates IRE1 signaling in HRCCs.

Metabolic stress generates a tubular inflammatory response. We next tested whether metabolic stress could promote tubular inflammation. We evaluated the expression of various proinflammatory cytokine and chemokine transcripts during metabolic stress. These transcripts are expressed during acute kidney injury.⁴ HRCCs exposed to metabolic stress showed biphasic expression patterns for IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 and RANTES, whereas CX3CL1 and IL-1 β expression did not increase (Figure 3a). IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α expression levels peaked early, between 2 and 8 h after stimulation, followed by significant expression inhibition beginning after 12 h. RANTES expression profile was different from the other cytokines, as its expression was maintained even after 12 h, time at which the other cytokines were downregulated. Hierarchical clustering of the gene expression profiles suggested that metabolic stress and the ER stress inducer tunicamycin promote similar proinflammatory profiles which are different from that induced by TNF- α (Figure 3a). These results suggest that ER stress (chemically or metabolically induced) and the prototypical proinflammatory cytokine TNF- α generate distinct tubular inflammatory profiles. C/EBP β , a transcription factor that inhibits the proinflammatory properties of ER stress, was transiently induced by metabolic stress and could, at least in part, be responsible for the biphasic patterns (Figure 3b).

Metabolic stress activates NF- κ B signaling. Inflammatory responses to stress usually involve NF- κ B signaling. HRCCs challenged with metabolic stress activated NF- κ B signaling. Indeed, the expression of the NF- κ B repressor I κ B α was transiently reduced (Figure 3c, left) and NF- κ B p65/RelA expression was transiently increased during metabolic stress (Figure 3c, right). Moreover, the nuclear translocation of the transcriptional factor NF- κ B p65/RelA was observed by immunofluorescence imaging in the same conditions, 2 h after the initiation of the stress (Figure 3d). Taken together, these results suggest that metabolic stress activates the proinflammatory NF- κ B pathway. We next hypothesized that the UPR activated during metabolic stress could promote tubular inflammation.

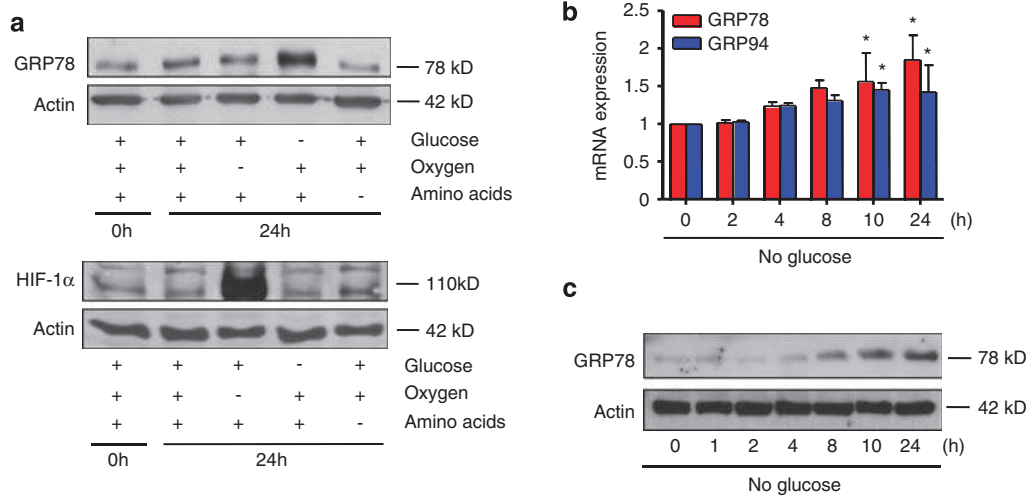


Figure 1 Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage promote ER stress. (a) GRP78 and HIF-1 α expression during various metabolic stresses. Levels of GRP78 (top) and HIF-1 α (bottom) expression are shown from HRCs incubated in glucose- or amino acids-deficient culture media or challenged with hypoxia for 24 h. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. (b) Metabolic stress promotes chaperones genes transcription. HRCs were cultured in glucose-deprived culture medium for the indicated periods. *GRP78* and *GRP94* transcripts levels, measured by qRT-PCR, are presented as mean \pm S.E.M. relative to levels before metabolic stress over three independent experiments. * $P < 0.05$. (c) Metabolic stress promotes time-dependent GRP78 expression. HRCs were cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods and GRP78 protein expression was determined by immunoblotting. A representative immunoblot of three independent experiments is shown

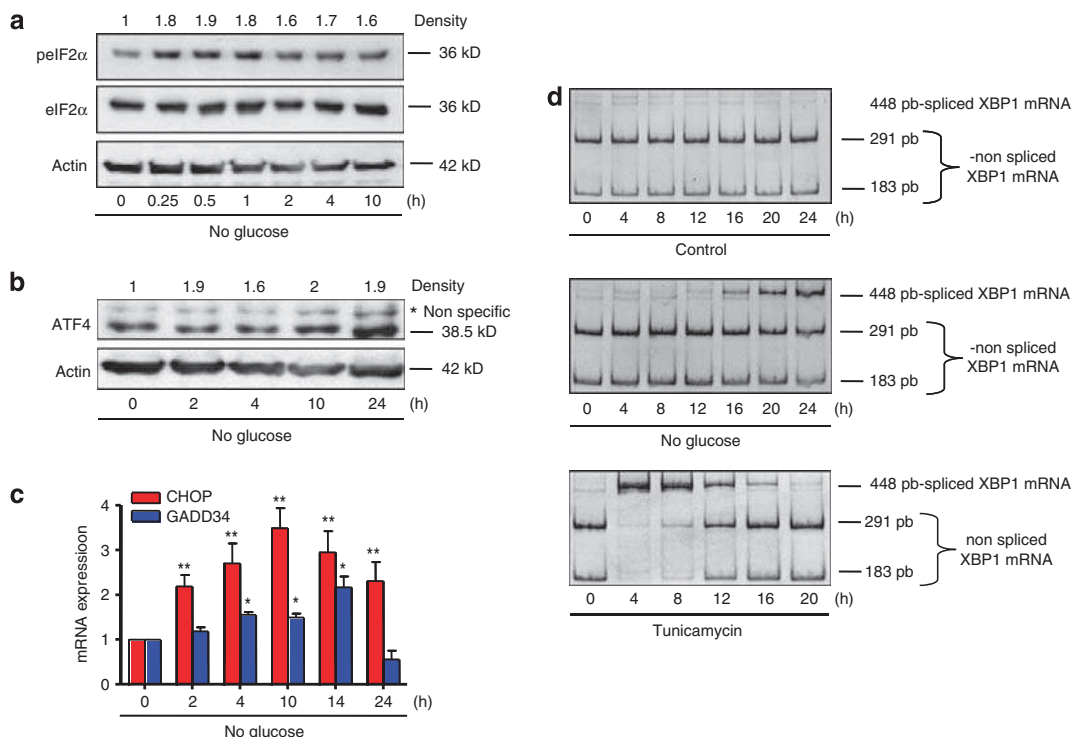


Figure 2 Metabolic stress activates the PERK and IRE1 pathways. (a) eIF2 α is phosphorylated during metabolic stress. Phospho-eIF2 α expression was evaluated by immunoblotting in HRCs cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. Density refers to p-eIF2 α /total eIF2 α . (b) ATF4 expression is upregulated during metabolic stress. ATF4 protein expression was evaluated by immunoblotting in HRCs cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. (c) *CHOP* and *GADD34* transcripts expression is upregulated under metabolic stress. HRCs were cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. Transcripts levels, measured by qRT-PCR, are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels before metabolic stress for three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (d) Metabolic stress promotes XBP1 splicing. HRCs were subjected to a time course of tunicamycin (2 μ g/ml) exposure or cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. *XBP1* mRNA splicing was examined by PCR and followed by migration in polyacrylamide gels. See the Material and Methods section for more details

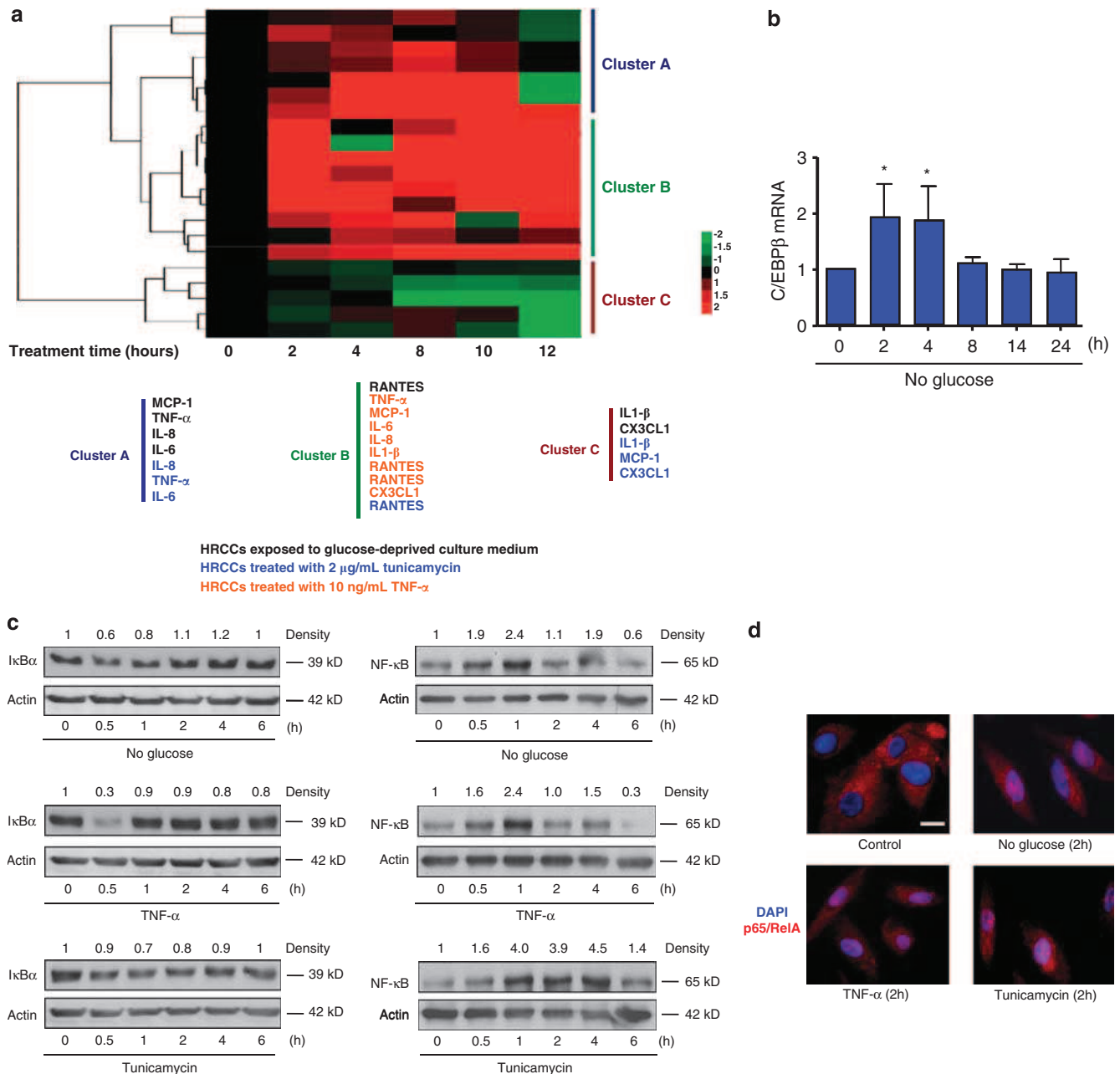


Figure 3 Metabolic stress generates a tubular inflammatory response and activates NF- κ B signaling. **(a)** Heat Map of cytokines expression profiles. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium or incubated with tunicamycin (2 μ g/ml) or TNF- α (10 ng/ml). IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, RANTES, CX3CL1 and IL-1 β transcripts levels were measured by qRT-PCR. Expression levels shown are representative of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtained from eight independent replicates at each time point. Time resolved supervised hierarchical clustering of transcripts expression was performed. The brightness of the green and red represents the degree to which expression was lower or higher, respectively, in the HRCCs relative to cells before treatment. **(b)** C/EBP β is transiently upregulated during metabolic stress. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium. C/EBP β transcripts levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E.M. relative to levels in cells before treatment for three independent experiments. **(c)** I κ B α is degraded and NF- κ B p65/RelA expression is increased during metabolic stress. Protein expression of I κ B α (left) and NF- κ B p65/RelA (right) in HRCCs cultured in glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml TNF- α or 2 μ g/ml tunicamycin for the indicated periods was evaluated. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. **(d)** NF- κ B p65/RelA translocates in the nucleus during metabolic stress. NF- κ B p65/RelA nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence analysis. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml TNF- α or 2 μ g/ml tunicamycin for 2 h. Cells were counterstained with DAPI to visualize the nuclei. White bar = 10 μ m. A representative picture of three independent experiments is shown

The PERK pathway is not required for triggering tubular inflammation during metabolic stress. We transiently inhibited PERK signaling during metabolic stress by RNA interference using synthetic small interfering RNA (siRNA) directed against the PERK mRNA (Figure 4a). PERK

inhibition did not seem to alter NF- κ B signaling because the I κ B α expression profiles were similar during metabolic stress with or without PERK knockdown (Figure 4b). PERK inhibition did not alter cytokines expression profiles (not shown). This result suggests that the PERK pathway is not

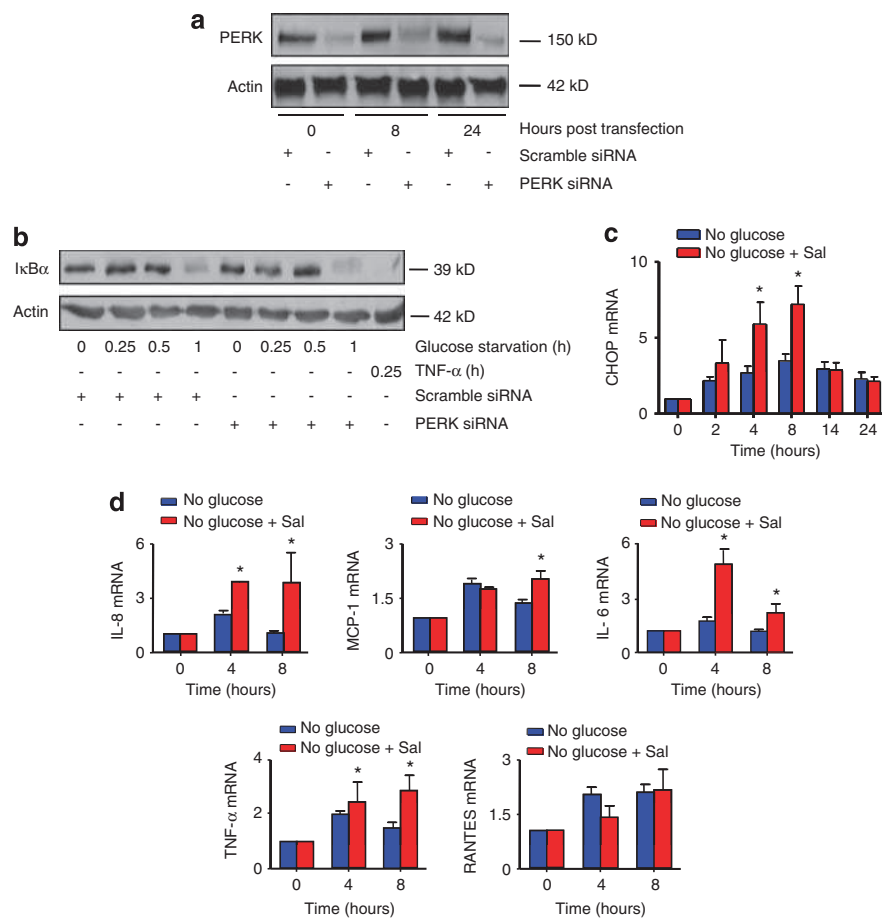


Figure 4 PERK is not required for triggering tubular inflammation during metabolic stress. (a) RNA interference directed against *PERK* transcripts. HRCCs were transfected with siRNA targeting *PERK* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and the PERK protein level was measured at different periods of time. A representative analysis of PERK by immunoblotting is shown ($n = 3$). (b) PERK inhibition does not reduce $I\kappa B\alpha$ degradation during metabolic stress. $I\kappa B\alpha$ protein levels are shown in HRCCs transfected with either PERK or scramble siRNA or control cells. At 24 h post transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml TNF- α for 15 min. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. (c) Salubrinal amplifies PERK signaling during metabolic stress. HRCCs were incubated with glucose-deficient medium for various periods of time with or without 20 μ M salubrinal. *CHOP* transcripts were measured by qRT-PCR after different periods of time. Transcripts expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in non-treated cells and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$. (d) Salubrinal amplifies tubular inflammation during metabolic stress. HRCCs were incubated with glucose-free medium for various periods of time with 20 μ M salubrinal. *IL-6*, *IL-8*, *TNF- α* , *RANTES* and *MCP-1* transcripts were measured by qRT-PCR after different periods of time. Transcripts expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to levels in control cells and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$

required for the initiation of tubular inflammation during metabolic stress. To activate the PERK pathway, we incubated HRCCs with salubrinal, a molecule that selectively blocks eIF2 α dephosphorylation via inhibiting the serine/threonine phosphatase PP1 and amplifies the activation of the PERK pathway, among other effects. Salubrinal promoted the activation of the PERK pathway, as exemplified by the overexpression of CHOP during metabolic stress (Figure 4c). Salubrinal also amplified the expression of proinflammatory cytokines and chemokines (but not RANTES) during metabolic stress (Figure 4d). Together, these results suggest that PERK signaling during metabolic stress does not seem to be required for mediating tubular inflammation but could constitute an accessory pathway that promotes tubular inflammation when selectively activated.

The IRE1 pathway mediates tubular inflammation during metabolic stress. We next focused on IRE1 signaling

during metabolic stress. IRE1 inhibition was effective after siRNA transfection (Figure 5a). Regarding NF- κ B signaling, IRE1 inhibition reduced $I\kappa B\alpha$ degradation, NF- κ B p65/RelA increase and NF- κ B p65/RelA nuclear translocation during metabolic stress (Figure 5b). IRE1 inhibition was associated with reduced expression levels of proinflammatory cytokines during metabolic stress, including IL-8, RANTES, TNF- α and IL-6 to a lesser extend (Figure 5c). MCP-1 expression during metabolic stress did not seem to depend on IRE1 signaling (data not shown). These experiments suggest that metabolic stress generates tubular inflammation that is in part mediated by IRE1-dependent NF- κ B signaling.

Cold ischemia in rat kidneys induces ER stress and promotes inflammation. To translate our *in vitro* findings to an *in vivo* setting, we reproduced cold ischemia conditions encountered during kidney transplantation and analyzed

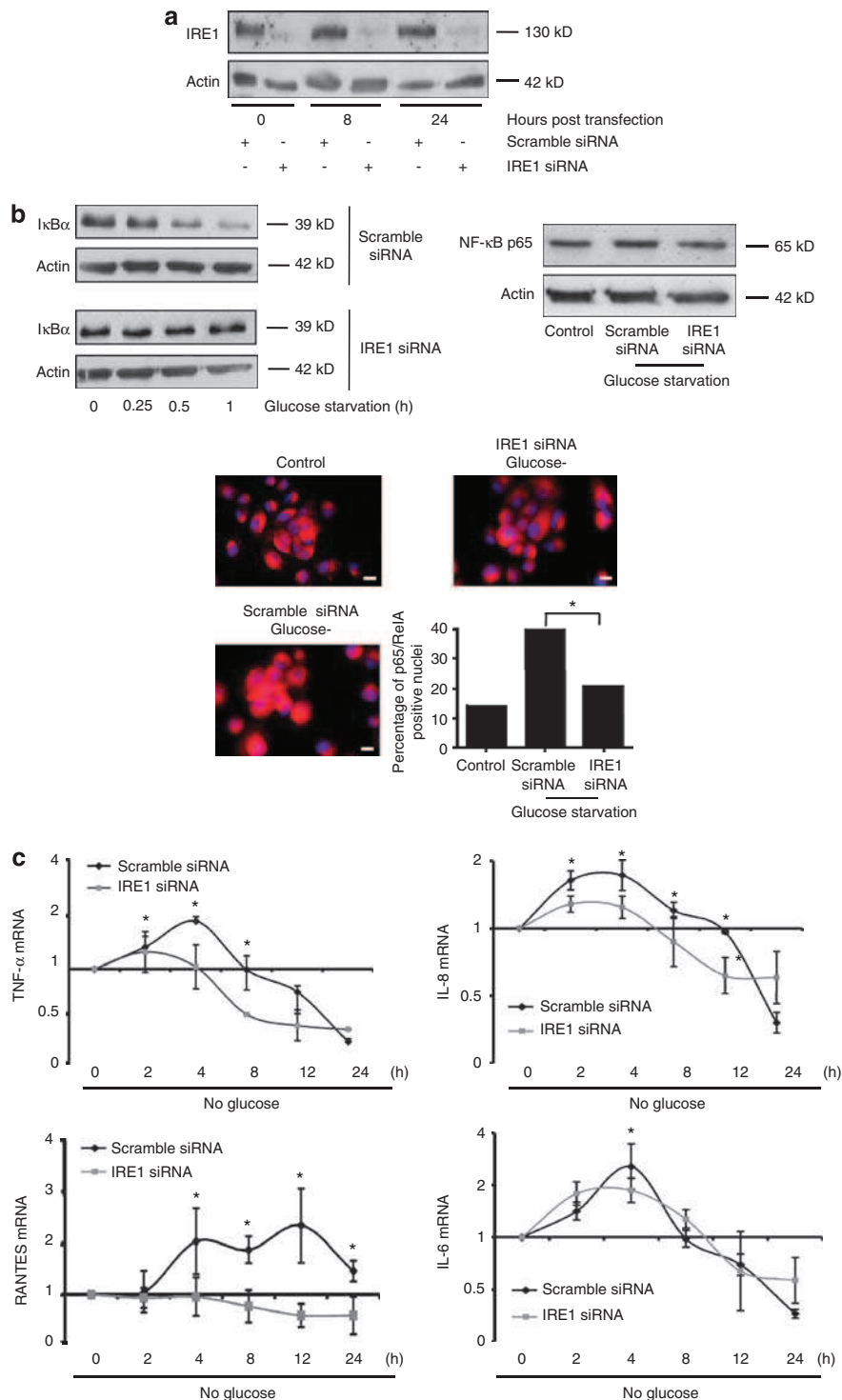


Figure 5 IRE1 mediates tubular inflammation during metabolic stress. (a) RNA interference directed against *IRE1* transcripts. HRCCs were transfected with siRNA targeting *IRE1* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and the IRE1 protein level was measured at different periods of time. A representative analysis of IRE1 by immunoblotting is shown ($n = 3$). (b) IRE1 inhibition inhibits NF- κ B activation during metabolic stress. Left: IκB α protein levels are shown in HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA. At 24 h after transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-free medium. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. Right: NF- κ B p65 protein levels are shown in HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA. At 24 h after transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-free medium. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. Bottom: NF- κ B p65/RelA nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence analysis. HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA were cultured for 2 h in glucose-deficient medium. Cells were counterstained with DAPI (blue) to visualize the nuclei. White bar = 10 μ m. Nuclear NF- κ B p65/RelA (red) staining is quantified by dividing the number of positive cells by the total number of cells at magnification $\times 10$. (c) IRE1 inhibition reduces tubular inflammation during metabolic stress. HRCCs were transfected with siRNA targeting *IRE1* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and *IL-8*, *IL-6*, *TNF- α* and *RANTES* transcripts were measured by qRT-PCR at different periods of time. Transcripts expression levels are presented as a mean \pm S.E.M. relative to levels in cells transfected with control siRNA and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$

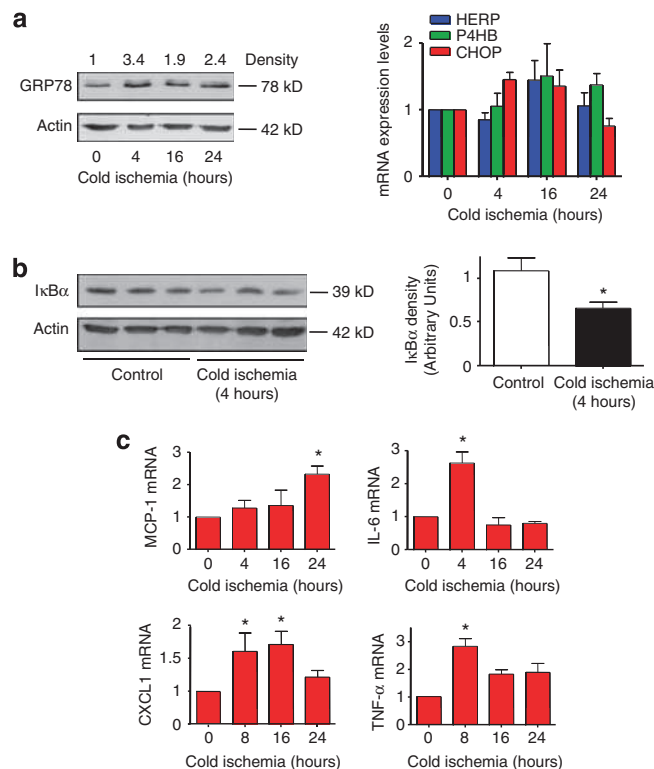


Figure 6 Cold ischemia in rat kidneys activates ER stress and generates an inflammatory response. (a) Cold ischemia promotes endoplasmic reticulum stress in rat kidneys. Rats were nephrectomized and kidneys were rinsed and incubated in an IGL1 solution for up to 24 h. Left: GRP78 protein levels in rat kidneys after various times of cold ischemia were measured. A representative immunoblot is shown. Right: expression levels of the *HERP*, *P4HB* and *CHOP* transcripts in rat kidneys after 0, 4, 16 or 24 h of cold ischemia were measured by qRT-PCR. Expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in rat kidneys before cold ischemia, $n = 4$ per group. (b) Cold ischemia promotes IκBα degradation in rat kidneys. IκBα protein levels in rat kidneys after 4 h of cold ischemia were measured. A representative immunoblot and densitometric analysis are shown. (c) Cold ischemia promotes inflammation in rat kidneys. *IL-6*, *TNF-α*, *MCP-1* and *CXCL1* transcripts expression levels in rat kidneys after various times of cold ischemia were measured by qRT-PCR. Expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in rat kidneys before cold ischemia, $n = 4$ per group. * $P < 0.05$

whether acute ischemia produces ER stress and inflammation in rat kidneys. Rats were nephrectomized and kidneys were conserved in IGL1 (Institute Geroges Lopez, Lyon, France) at 4 °C for various periods of time. The ER stress surrogate marker GRP78 was expressed as early as at 4 h after nephrectomy and was maintained after 24 h (Figure 6a, left). The expression levels of other ER stress markers including CHOP, protein disulfide isomerase and HERP were also increased during acute ischemia (Figure 6a, right). These results suggest that ER stress and the UPR are activated in rat kidneys during acute ischemia. We next characterized the inflammatory processes in ischemic rat kidneys. IκBα expression was downregulated following cold ischemia, suggesting that NF-κB signaling is activated in the cortex of ischemic kidneys (Figure 6b). Kidney ischemia promoted expression cytokines, including IL-6, TNF-α, MCP-1 and the neutrophil chemoattractant CXCL1, a murin homolog of human IL-8 (Figure 6c). Whether ER stress is directly responsible the kidney inflammation during 'cold' ischemia *in vivo* remains to be definitely demonstrated, but our results strongly suggest that these two processes are linked.

ER stress and NF-κB activation are associated in renal allograft biopsies. Finally, we performed an immunohistological study in 18 preimplantation human renal

allograft biopsies to investigate whether ER stress and NF-κB activation are present after acute ischemia. These biopsies were performed just before the kidney transplantation and constitute an interesting human model of acute ischemia. We compared the expression levels of GRP78 between these samples and 15 control biopsies performed at 3 months post transplant in stable patients with a normal renal function. Living donor kidneys were excluded. The mean \pm S.E.M. cold ischemia time was 18 ± 3 h. Control biopsies displayed a low, if not, tubular GRP78 staining; in preimplantation biopsies a strong perinuclear staining was observed (Figure 7a), suggesting that cold ischemia induces ER stress in renal allografts before transplantation. The semiquantitative evaluation showed that GRP78 expression is significantly higher in the preimplantation group than the control group (Figure 7a). In the same manner, NF-κB p65/RelA nuclear staining was found in the preimplantation group, whereas the control group displayed weak staining (Figure 7b). NF-κB p65/RelA nuclear staining was significantly higher in the preimplantation group than in the control group (Figure 7b). Finally, we found that GRP78 and NF-κB p65/RelA colocalized in the same tubules, suggesting that these two processes are linked (please compare preimplantation biopsies on Figures 7a and b). GRP78 and NF-κB p65/RelA colocalized cortical tubular cells, a finding

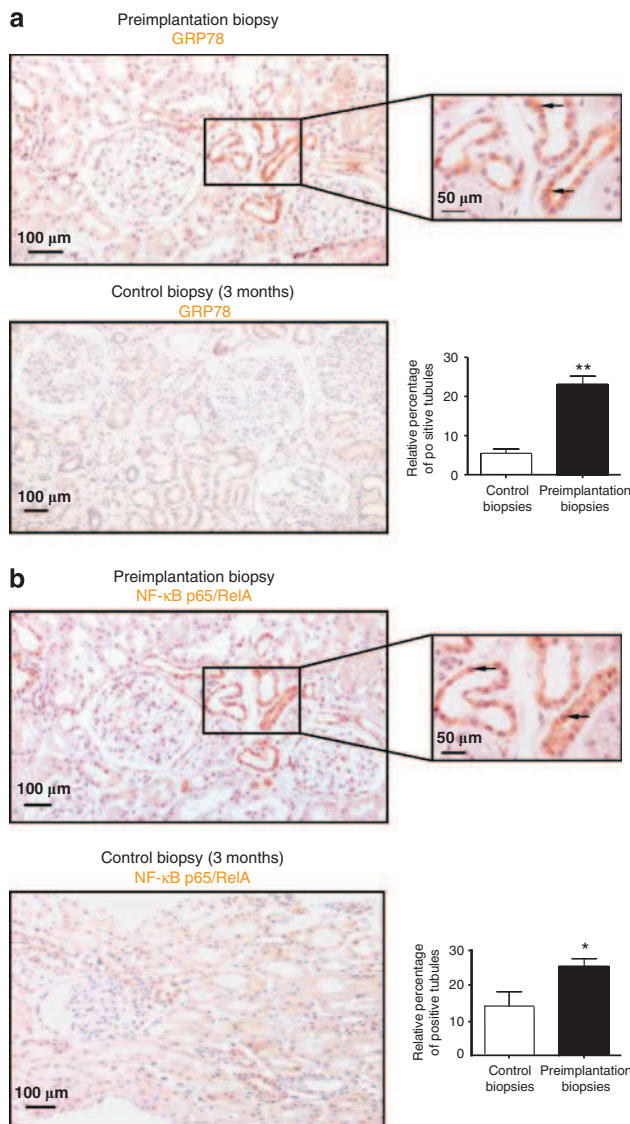


Figure 7 ER stress and NF- κ B activation are associated in renal allograft biopsies. **(a)** Tubular expression of GRP78 is upregulated following cold ischemia in human kidney allografts. Left: a representative image of GRP78 immunohistochemistry in a preimplantation biopsy with a perinuclear staining (arrows) and a control biopsy. Right: quantification of tubular GRP78 staining in preimplantation biopsies compared with controls (protocol biopsies performed 3 months after transplantation). $n = 18$ for preimplantation biopsies and $n = 15$ for the control group. $**P < 0.01$. **(b)** NF- κ B signaling is activated following cold ischemia in human kidney allografts. Left: a representative image of NF- κ B p65/RelA immunohistochemistry in preimplantation biopsy with nuclear staining (arrows) and control biopsy. Right: quantification of tubular NF- κ B p65/RelA staining in preimplantation biopsies compared with controls (protocol biopsies performed 3 months after transplantation). $n = 18$ in preimplantation biopsies and $n = 15$ in the control group. $*P < 0.05$.

that confirms our *in vitro* findings on HRCCs. In conclusion, acute kidney ischemic injury promotes tubular ER stress and activates the NF- κ B pathway in human renal allografts.

Discussion

Cellular responses to acute kidney ischemia promote profound biological alterations that lead to metabolic

adaptation and cell survival in the injured milieu. Complex biological pathways are activated to reduce cellular energy expenditure, activate anaerobic glycolysis, increase blood supply and nutrient transport and ultimately maintain cell viability. Ischemia induces metabolic stress that is secondary to oxygen, amino acids and glucose deprivation and activates complex evolutionarily conserved responses, including the UPR. Although this adaptive response promotes cell survival and adaptation to metabolic stress, it also generates distress signals that could locally promote inflammation. This concept is important because a proinflammatory microenvironment is known to favor the adaptive immune response.¹⁹ The precise mechanisms by which renal tubular cells initiate this proinflammatory response remain to be definitively elucidated.

In this study, we identified the UPR as a new factor in the induction of an inflammatory response during metabolic challenge. Tubular epithelial cells may generate a proinflammatory microenvironment during acute ischemic kidney injury as a consequence of extracellular stimuli including complement activation²⁰ or activation of TLRs by high-mobility group B1, heat shock proteins, hyaluronans and biglycans.^{9,10} Although these studies highlight the important role of epithelial cells in inflammation following acute kidney injury, they rely on the role of above mentioned extracellular mediators. Here we demonstrate that intracellular stress induced by glucose deprivation promotes tubular inflammation generating a proinflammatory microenvironment prone to the development of alloimmunity.

We observed a biphasic profile of NF- κ B and cytokines expression during metabolic stress, suggesting that although ER stress may induce proinflammatory molecules via transient activation of NF- κ B in the early phase and suppression in later phase. Previous work demonstrated that C/EBP β , a transcriptional factor whose expression has been shown to increase during ER stress through ill-defined mechanisms, interacts with and inhibits NF- κ B during ER stress.²¹ As we found that C/EBP β is expressed during metabolic stress, one can speculate that ER stress is possibly involved not only in the initiation of renal inflammation but also in its resolution. Whether this inhibitory process occurs *in vivo* and in a human setting remains to be determined. Intriguingly, RANTES expression profile during glucose starvation is different from the other cytokines. There is indeed a biphasic activation of RANTES that persists even after 12 h, time at which the other cytokines evaluated are already down-regulated. The functional significance of these findings for T-cell accumulation at the site of inflammation remains to be demonstrated. Given the chemotactic activity of RANTES that brings T cells, dendritic cells and NK cells to sites of inflammation, one can speculate that RANTES can have detrimental effects via the recruitment of immune cells that enhance inflammatory processes and promote alloimmunity during ischemia.

The detailed mechanisms by which NF- κ B is activated under ER stress are poorly understood. The UPR can directly promote NF- κ B activation through a PERK-eIF2 α -mediated translation attenuation.²² Because the half-life of I κ B α is much shorter than that of NF- κ B transcriptional factors, attenuating translation increases the ratio of NF- κ B to I κ B α and frees NF- κ B to translocate to the nucleus in response to ER stress.

In response to ER stress, the autophosphorylation of IRE1 induces a conformational change in its cytosolic domain, which can then bind to the adapter protein tumor necrosis factor-associated receptor 2 (TRAF2). The IRE1 α -TRAF2 complex recruit I κ B kinase, which phosphorylates I κ B α , leading to its degradation and the nuclear translocation of NF- κ B.²³ The IRE1 α -TRAF2 complex can also recruit the protein kinase JNK, leading to the activation of JNK and the phosphorylation of the transcription factor AP1.²⁴ Our data suggest that the IRE1 and PERK transducers are different drivers of NF- κ B signaling and promote non-redundant cytokine expression profiles. These results are of importance because IRE1 and PERK are differentially activated depending on the cell type, the nature, the intensity and duration of stimuli. Thus, deciphering their respective role in mediating tubular inflammation during ischemic injury could help to better understand the links between ischemic injuries and innate immunity activation.

The UPR is involved in renal tissue response following acute ischemic injury and has a complex role in regulating cell adaptation to stressful conditions and promoting cellular demise.^{16,25} Recent studies have suggested that the UPR is responsible for the inhibition of protein synthesis that occurs in rat kidneys after ischemia-reperfusion (IR) and participates in the onset of renal tubular injury.^{26,27} Conversely, preconditioning of renal epithelial cells in culture with ER stress inducers protects against oxidative assault (reperfusion) and cytotoxicity, suggesting that the cells were protected from injury if ER stress precedes the ischemic assault.²⁸ The ambivalent detrimental and cytoprotective properties of the UPR parallel our findings regarding proinflammatory and anti-inflammatory properties of the UPR during metabolic stress. Understanding this dynamic process is of great importance to develop nephroprotective strategies that target the UPR.

Our findings should be interpreted in the setting of 'pure' acute ischemia rather than as the consequences of IR because we did not analyze ER stress and inflammation after reperfusion injury. The classical model used to analyze tissue response after acute ischemia is the IR model characterized by the clamping of the renal artery for 30 minutes or more (i.e., warm ischemia) followed by reperfusion. Although widely accepted, this model does not reflect the kind of IR injury that occurs in renal transplantation because that ischemic changes occur in a kidney that has been profusely rinsed and is devoid of blood, and the duration of cold ischemia time can be a few hours to >30 h. The consequences of these two kinds of ischemia are clinically and biologically different. However, the model we used does not take into account the consequences of the reperfusion injury that are known to produce oxidative stress and is known to trigger ER stress.

In conclusion, we demonstrated that ischemia promotes tubular ER stress and activates the UPR, *in vitro*, *in vivo* and in human allograft biopsies collected before kidney implantation. The UPR is involved in mounting an inflammatory tubular response that could help to constitute the proinflammatory microenvironment known to encourage the adaptive immune response.

Materials and Methods

Cell culture. HRCCs were recovered from human nephrectomy specimens and cultured according to previously published methods.²⁹ Hypoxia experiments were

performed using the Anaerocult P kit (Merck, VWR, Fontenay sous Bois, France) following manufacturer instructions. To produce metabolic stress, HRCCs were incubated in a nutrient-deprived culture medium. Nutrient culture medium was DMEM supplemented with 1% fetal calf serum and penicillin-streptomycin.

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Labtech, Palaiseau, France). Transcript expression levels were quantified by SYBR green real-time PCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Vehicle-treated samples were used as controls, and fold changes for each tested gene were normalized to housekeeping genes (ribosomal protein L13A for *in vitro* analyses and TATA-box-binding protein for *in vivo* analyses). The relative expression levels between samples were calculated using the comparative delta C_t (threshold cycle number) method.³⁰ Primers are listed in Supplemental Table 1.

Protein extraction and western blot analysis. Protein extraction and immunoblotting were performed as previously described.²⁹ Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2.

Immunofluorescence microscopy. HRCCs were cultured on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde, rinsed with phosphate-buffered saline and blocked with 2% bovine serum albumin. Cells were permeabilized with Triton X-100 and incubated with a rabbit anti NF- κ B p65/RelA antibody. Samples were then incubated with an anti-rabbit Cyamine 3-coupled antibody (Jackson ImmunoResearch, Marseille, France). Then, cells were washed and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Slides were mounted and viewed using a Nikon Eclipse TE 2000E (Nikon, Champigny sur Marne, France) imaging fluorescence microscope. Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2.

siRNA transfections. PERK, IRE1 and scramble (control) siRNAs were designed and obtained from Qiagen. Transfection was performed using HiPerFect (Qiagen) as the transfection reagent and following the manufacturer protocol.

Analysis of XBP1 processing. HRCCs were exposed to metabolic stress or tunicamycin, and the XBP1 cDNA encompassing the region of restriction site was amplified by PCR using the following primers forward 5'-aaacagatgacagctca-3' and reverse 5'-tcctctgggtagacctctggag-3' and the PCR product was incubated with the Pst1 restriction enzyme for 1 h at 37 °C, and the restriction digests were separated on a 8% polyacrylamide gel with ethidium bromide. The gels were photographed under UV transillumination and quantified by densitometry. The XBP1 mRNA that was resistant to Pst1 and therefore already spliced and activated was detected as a 448-bp, Pst1-, amplification product, which is indicative of spliced XBP1 mRNA. XBP1 PCR products were digested with Pst1 (Pst1 +), to produce 291-bp and 183-bp amplification products, which indicate a predominance of the native, unspliced form of the XBP1 mRNA.

In vivo study. To characterize acute kidney ischemia injury that occurs before kidney transplantation, we nephrectomized rats and we conserved rinsed kidneys in a conservation solution, namely IGL1, at 4 °C for various periods of time. This experiment in rats promotes cold ischemia similar to that observed in human renal kidneys before transplantation. Adult male Sprague-Dawley rats were assigned to one of five groups of four animals each. Rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine. The abdomen was then opened through a midline incision and the kidneys were perfused with cold heparinized saline. Kidneys were next washed with IGL1 followed by incubation in IGL1 during 0 h, 4, 8, 16 and 24 h at 4 °C. All procedures were performed strictly under the Paris Descartes University Animal Care recommendations.

Renal allograft biopsies and immunohistochemistry. In all, 18 preimplantation biopsies were analyzed for GRP78 and NF- κ B p65/RelA staining. In all, 15 protocol biopsies performed at 3 months post transplant in stable patients with a normal renal function and who received treatment with tacrolimus, prednisone and mycophenolate mofetil were used as control. Patients wrote informed consent at the time of the transplantation. Pathological examination was strictly normal using Banff scoring. The sections were incubated with an anti-GRP78 rabbit polyclonal antibody or a rabbit anti-NF- κ B p65/RelA antibody. The sections were then

incubated with anti-rabbit antibody conjugated to a peroxidase-labeled polymer (Dako, Trappes, France). Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2. Tubular GRP78 and NF- κ B p65/RelA staining were quantified by dividing the number of positive tubules by the total quantified at $\times 20$ magnification.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm S.E.M. of three different experiments, unless otherwise specified. Biological and histological data were compared using non-parametric tests. We used the Mann-Whitney *U*-test for non-parametric data comparisons between two groups, and the Student's test for parametric data. Statistical analyses were performed using Prism-GraphPad software (GraphPad Prism4, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *P*-values of < 0.05 were considered significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Monique Diry and Jean-Pierre Flinois for their technical assistance. This work has been supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Author's contributions

SF performed all of the experiments; NB performed *in vivo* studies; DA generated primary cultured cells; CL, ET and PB supervised the project; NP designed the study and wrote the paper.

- Bonventre J. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. *Contrib Nephrol* 2007; **156**: 213–219.
- Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; **81**: 643–654.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh M, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; **364**: 1814–1827.
- Bonventre J, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; **66**: 480–485.
- Anders H. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1270–1274.
- Anders H, Schlondorff D. Innate immune receptors and autophagy: implications for autoimmune kidney injury. *Kidney Int* 2010; **78**: 29–37.
- Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000; **15**: 290–301.
- Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2964–2966.
- Leemans J, Stokman G, Claessen N, Rouschop K, Teske G, Kirschning C *et al*. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2894–2903.
- Wu H, Chen G, Wyburn K, Yin J, Bertolino P, Eris J *et al*. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2847–2859.
- Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; **454**: 455–462.
- Lee D, Hung M. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle* 2007; **15**: 3011–3014.
- Nizet V, Johnson R. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 609–617.
- Sumpter RJ, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 699–711.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY *et al*. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 411–421.
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; **101**: 451–454.
- Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25935–25938.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2656–2664.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**: 301–305.
- Akcaay A, Nguyen Q, Edelstein C. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009; **2009**: 137072.
- Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, Okamura M, Huang T, Saito Y *et al*. ER stress depresses NF- κ B activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 73–81.
- Deng J, Lu P, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman R, Sonenberg N *et al*. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10161–10168.
- Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* 2003; **26**: 931–935.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP *et al*. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; **287**: 664–666.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519–529.
- Kuznetsov G, Bush KT, Zhang PL, Nigam SK. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8584–8589.
- Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, Rossi NF, Degraia DJ. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1741**: 314–324.
- Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29317–29326.
- Pallet N, Thervet E, Le Corre D, Knebelmann B, Nusbaum P, Tomkiewicz C *et al*. Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int* 2005; **67**: 2422–2433.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Article 2 : La réponse UPR régule la réponse angiogénique dans l'épithélium rénal lors d'un stress ischémique.

Bouvier N, **Fougeray S**, Beaune P, Thervet E, Pallet N. The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem*, 287: 14557-68, 2012.

Le greffon rénal, soumis à une ischémie, ne peut pas pleinement satisfaire aux demandes énergétiques des cellules. Les réponses induites par l'ischémie, comme l'angiogenèse, ont pour objectif d'augmenter l'apport en énergie et d'en réduire les dépenses. L'épithélium tubulaire rénal participe à ce processus d'adaptation en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGFA et en activant la réponse UPR.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la réponse UPR dans la régulation de la production de facteurs angiogéniques par l'épithélium rénal lors de l'ischémie.

Nous avons démontré que les cellules tubulaires rénales soumises à une carence en glucose sécrètent le facteur de croissance vasculaire endothélial VEGFA et le facteur de croissance fibroblastique bFGF ainsi que l'angiogénine ANG, indépendamment de la voie HIF-1 α , et active également la voie UPR. L'inhibition de *PERK* par des siRNA diminue l'expression de VEGFA et de bFGF alors que l'inhibition de *IRE1* et *ATF6* par cette même technique ne modifie pas l'expression de ces deux facteurs, ce qui montre que la voie PERK est un régulateur central de la réponse angiogénique. De plus, l'inhibition de *PERK* augmente l'expression de ANG, un puissant stimulateur de l'angiogenèse ; et l'inhibition de *IRE1* diminue son expression suggérant que IRE1 α régule positivement la production de ANG et PERK inhibe sa sécrétion. L'ANG étant un répresseur de la traduction, ces résultats laissent également supposer un nouveau mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique via la réponse UPR. Enfin, nous avons montré que l'ischémie aiguë induite chez le rat, active la réponse UPR parallèlement à l'augmentation de l'expression de VEGFA, bFGF et ANG.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence le rôle de la réponse UPR dans la régulation de l'angiogenèse dans l'épithélium rénal et de caractériser d'autres fonctions de la réponse UPR lors de l'inhibition de la voie PERK/eIF2 α .

The Unfolded Protein Response Regulates an Angiogenic Response by the Kidney Epithelium during Ischemic Stress^{*§}

Received for publication, January 8, 2012, and in revised form, March 2, 2012. Published, JBC Papers in Press, March 8, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.340570

Nicolas Bouvier^{†§}, Sophie Fougeray^{†§}, Philippe Beaune^{†§¶}, Eric Thervet^{†§||}, and Nicolas Pallet^{†§1}

From [†]INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Peres, Paris, France, the ^{||}Service de Nephrologie, and [¶]Pole de Biologie, Hopital Europeen Georges Pompidou, Paris 70115, France, and the [§]Universite Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris 75065, France

Background: It is unknown whether the unfolded protein response (UPR) mediates an angiogenic response during kidney ischemia.

Results: The UPR regulates the expression of VEGFA, bFGF, and angiogenin independently of HIF-1 α , during kidney ischemia.

Conclusion: PERK is a central regulator of the angiogenic response to nutrient deprivation.

Significance: Our study identifies the UPR as a potential regulator of angiogenesis, independent of HIF-1 α .

Ischemic injuries permanently affect kidney tissue and challenge cell viability, promoting inflammation and fibrogenesis. Ischemia results in nutrient deprivation, which triggers endoplasmic reticulum stress, ultimately resulting in the unfolded protein response (UPR). The aim of this study was to test whether the UPR could promote an angiogenic response independently of the HIF-1 α pathway during ischemic stress in the human kidney epithelium. Glucose deprivation induced the secretion of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF) and angiogenin (ANG) in human kidney epithelial cells independently of HIF-1 α . Glucose deprivation, but not hypoxia, triggered endoplasmic reticulum stress and activated the UPR. RNA interference-mediated inhibition of the gene encoding the kinase PERK decreased VEGFA and bFGF expression, but neither gene was affected by the inhibition of IRE1 α or ATF6. Furthermore, we show that the expression of angiogenin, which inhibits protein synthesis, is regulated by both IRE1 α and PERK, which could constitute a complementary function of the UPR in the repression of translation. In a rat model of acute ischemic stress, we show that the UPR is activated in parallel with VEGFA, bFGF, and ANG expression and independently of HIF-1 α .

Chronic kidney structural deterioration progresses as a result of the dynamic combination of specific and nonspecific insults that engage cycles of cell death, inflammation, and healing, ultimately resulting in maladaptive tissue remodeling and loss of kidney function (1, 2). Ischemia occurs when the blood supply to the tissue is so restricted that it induces cellular stress and is a common factor in the progression of several, if not all, chronic kidney diseases, as it induces inflammation, epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis (3). A shortage of blood can produce ischemia, during which the tissues cannot fulfill their energetic demand. The cellular response to ischemia aims,

in a coordinated fashion, to improve the energy input (nutrients and oxygen) and reduce the energy expenditure. This improvement in the energy input relies on angiogenesis, the cellular expression of nutrient transporters, or catabolic processes including autophagy. Alternatively, the reduction of energy expenditure can be achieved by a reduction in protein translation, which is a highly energy-consuming process. During ischemia, the inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR)² signaling and the activation of the kinase PKR-like ER Kinase (PERK), mediate the general inhibition of translation. Of note, some of the proteins that are involved in the metabolic adaptation to ischemia, such as activated transcription factor 4 (ATF4), which can mediate angiogenesis (4), can be selectively translated and expressed despite the general inhibition of translation. At the cellular level, oxygen and nutrient deprivation activate adaptive mechanisms that maintain basal metabolism and vital functions. Although mainly protective, these signaling pathways also actively participate in tissue remodeling by promoting inflammation and fibrogenesis, which can result in interstitial fibrosis, tubular atrophy, capillary rarefaction, and loss of kidney function. These structural alterations cause a progressive deterioration of the vascular network and exchanging interfaces, changes that, in turn, aggravate ischemia (3, 5). Therefore, a better understanding of the biological processes activated within the cell in response to ischemia is critical both for the identification of potential therapeutic targets, and to slow structural kidney deterioration.

The best-known adaptive response to ischemia is the stabilization of the transcription factor Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α), which escapes from proteasomal degradation during hypoxia. HIF-1 α drives the transcription of genes involved in adaptive responses to hypoxia, which include angiogenesis,

² The abbreviations used are: mTOR, mammalian target of rapamycin; ATF, activated transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 α , elongation initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GRP, glucose-related protein; IRE1 α , inositol-requiring enzyme 1; PERK, protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase; UPR, unfolded protein response; PDI, protein-disulfide isomerase; HREC, human renal epithelial cells; XBP-1, X-box-binding protein 1; bFGF, basic fibroblast growth factor; ANG, angiogenin; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; HSP, homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress protein; PDI, protein-disulfide isomerase.

^{*} This work was supported by a grant from the Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM).

[§] This article contains supplemental Figs. S1–S4 and Tables S1 and S2.

¹ To whom correspondence should be addressed: INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Peres, 45 rue des Saints-Peres, 75006 Paris, France. Tel.: 33142862251; Fax: 33142862072; E-mail: npallet@yahoo.fr.

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

nutrient transport, glycolysis, and inhibition of apoptosis (6). The secretion of angiogenic factors by epithelial and endothelial cells during ischemia contributes to the maintenance of an intact tubulo-interstitial compartment and slows the progression of kidney disease, although the situation is complex, as a dysregulated angiogenic response can result in deleterious effects and amplify an injury (7, 8).

Other adaptive processes implicated in the response to nutrient and oxygen deprivation involve the mTOR kinase (9, 10) and the unfolded protein response (UPR) (11, 12). Hypoxia and glucose starvation promote ATP shortage, decrease the intracellular calcium concentration, impair the activity of chaperone molecules, interfere with disulfide bridge formation and impair the maturation of native proteins, a process that promotes endoplasmic reticulum (ER) stress and activates the UPR (12, 13). The UPR involves three major mediators, PERK, the protein kinase/endoribonuclease Inositol-requiring Enzyme 1 α (IRE-1 α) and the transcription factor ATF6. The role of the UPR is to modify cellular functions in response to ER stress and to re-establish normal ER function both at the translational and transcriptional levels. The UPR is responsible for the attenuation of general mRNA translation by the phosphorylated form of elongation Initiation Factor 2 α (eIF2 α) and transcriptional regulation of the UPR genes encoding chaperones, folding, and proteasomal degradation enzymes, and activation of macroautophagy (13, 14).

It is currently unknown whether the UPR mediates an angiogenic response during kidney ischemia. The aim of this study was to investigate whether the UPR modulates the production of angiogenic factors by the human kidney epithelium during ischemia. Here, we demonstrate that human renal epithelial cells (HREC) subjected to glucose deprivation secrete vascular endothelial growth factor A (VEGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF), and angiogenin (ANG) independently of HIF-1 α , and we identify the PERK pathway as a central regulator of this angiogenic response. Additionally, we show that the expression of the angiogenic mediator ANG, which is also a translational repressor, is regulated by both IRE1 α and PERK. This provides the basis for the characterization of other functions of the UPR in the inhibition of mRNA translation in addition to the PERK-eIF2 α pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—HREC of proximal origin (HK-2) were purchased from ATCC/LGC Standards and cultured according to previously published methods (15). Hypoxia experiments were performed using the Anaerocult® P kit (Merck Chemicals). The Anaerocult® kit is a small chamber that produces an anaerobic atmosphere due to the presence of chemicals that absorb oxygen, including iron powder, citric acid, sodium carbonate, and silica (kieselguhr), which are activated by water. The Petri dishes are incubated within these chambers, in which the estimated oxygen percentage is less than 0.1% beyond 1 h. This chamber can be placed in a tissue culture incubator. HREC were incubated in glucose-free DMEM to induce ischemic stress.

siRNA Transfections—PERK, IRE1 α , ATF6, and scramble (control) small interfering synthetic RNAs (siRNAs) were

designed and obtained from Qiagen. Transfection was performed using HiPerFect® (Qiagen) following the manufacturer's protocol.

RNA Extraction and Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)—Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit® (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000® spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Transcript expression levels were quantified by SYBR green real-time PCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems). Vehicle-treated samples were used as the controls, and fold changes for each tested gene were normalized to housekeeping genes (Ribosomal Protein L13A for *in vitro* and Tata-binding protein for *in vivo* analyses). The relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (threshold cycle number) method (16). Primers are listed in supplemental Table S1.

Protein Extraction and Western Blot Analysis—Total protein lysate from HREC was separated by sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions and transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare). Primary antibodies were visualized using horseradish peroxidase-conjugated polyclonal secondary antibodies (Sigma Aldrich) and detected by ECL reagent® (GE Healthcare). Antibody details are listed in the supplemental Table S2.

Cell Membrane Permeabilization Assessment—The level of cell necrosis was measured using the ToxiLight® BioAssay Kit (Cambrex), which is a bioluminescent assay designed to measure the release of adenylate kinase from damaged cells. Experiments were performed according to the manufacturer's protocol.

Enzyme-linked Immunosorbent Assays—Subconfluent cells were grown in 6-well plates for the indicated times under the indicated conditions. Secretion of VEGFA, bFGF, ANG, and PDGF-BB was quantified in the cell culture supernatant using the Quantikine® human VEGF immunoassay, the Quantikine® human bFGF immunoassay, the Quantikine® human ANG immunoassay and the Quantikine® human PDGF-BB immunoassay (RD Systems), respectively, according to the manufacturer's protocol. VEGFA, bFGF, ANG, and PDGF-BB concentrations in the culture medium were normalized to the number of cells in the plate.

In Vivo Experiments—Adult male Sprague-Dawley rats weighing 170–180 g were purchased from Charles River Laboratories. To characterize the acute kidney ischemia injury that occurs before kidney transplantation, we nephrectomized rats and rinsed the kidneys in IGL1® preservation solution at 4 °C for 24 h. The rats were anesthetized using intraperitoneal ketamine and xylazine. The abdomen was then opened by a midline incision, and the kidneys were perfused with cold heparinized saline. The kidneys were then washed with IGL1® and incubated with IGL1® for 24 h at 4 °C ($n = 4$ for each group). All procedures were strictly performed according to the Paris Descartes University Animal Care recommendations.

Statistical Analysis—All data are expressed as the mean \pm S.E. of three independent experiments, unless otherwise specified. Variables were compared with the Student's *t* test. Statis-

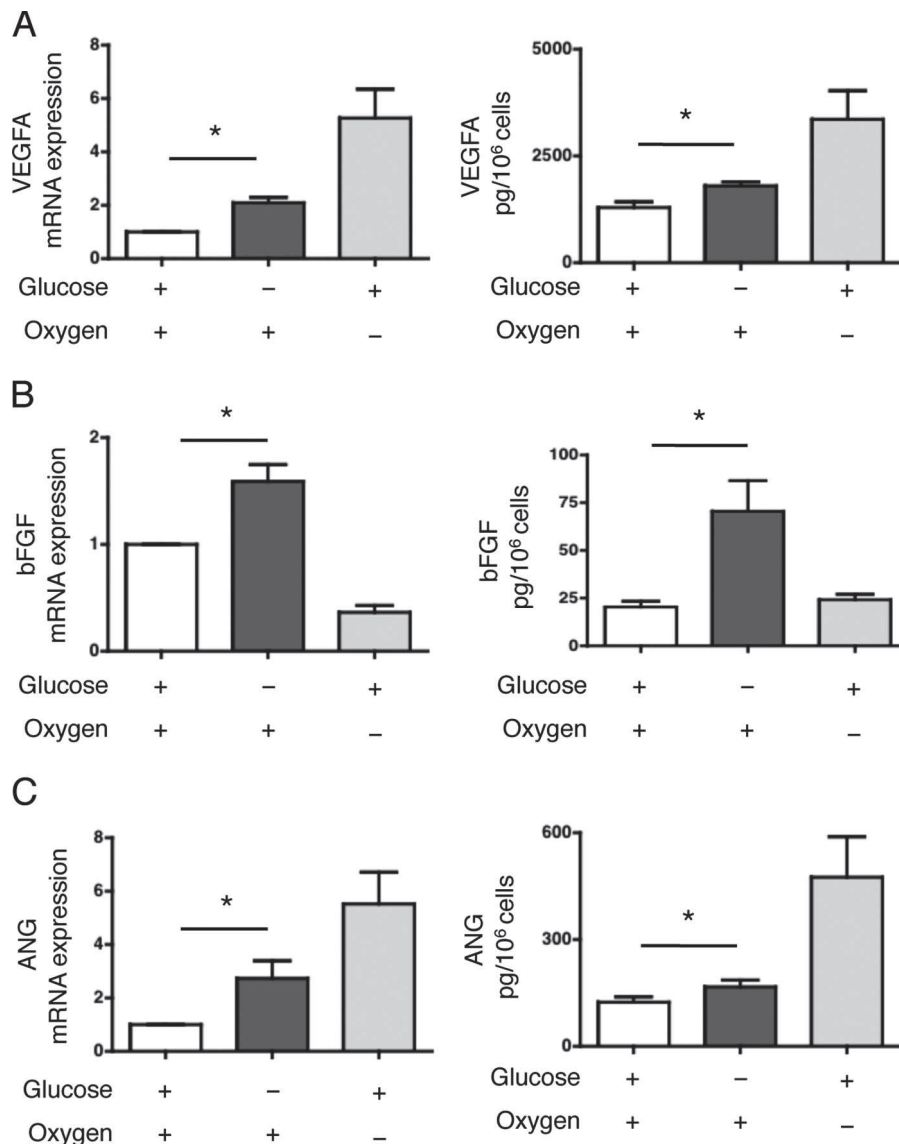


FIGURE 1. Glucose deprivation induces the expression of angiogenic mediators. A, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left*: VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right*: secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. $^*p < 0.05$. B, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left*: bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right*: secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. $^*p < 0.05$. C, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left*: ANG transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right*: secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. $^*p < 0.05$.

tical analyses were performed using Prism-GraphPad® software. p values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Glucose Deprivation Induces the Expression of Angiogenic Mediators—To test whether ischemia induces an angiogenic response within the human kidney epithelium, we monitored the expression of genes encoding mediators of angiogenesis in HREC exposed to glucose-deprived medium, hypoxia, or both. The combination of hypoxia and glucose starvation proved to be too cytotoxic within our cellular model to provide interpretable results (supplemental Fig. S1A). We analyzed the expres-

sion of VEGFA, bFGF, ANG, and platelet-derived growth factor β (PDGFB), as these mediators are important regulators of angiogenesis during kidney disease (7, 8, 17, 18).

After 24 h of culture in glucose-deprived culture medium under normoxic conditions, VEGFA expression was significantly increased compared with the controls (HREC cultured in standard conditions) at both the transcriptional and protein levels (Fig. 1A). As expected, hypoxia also promoted VEGFA expression in our model (Fig. 1A). Glucose starvation for 24 h significantly increased bFGF transcript levels relative to HREC cultured in standard conditions, whereas hypoxia did not alter bFGF gene expression (Fig. 1B). Glucose starvation, but not

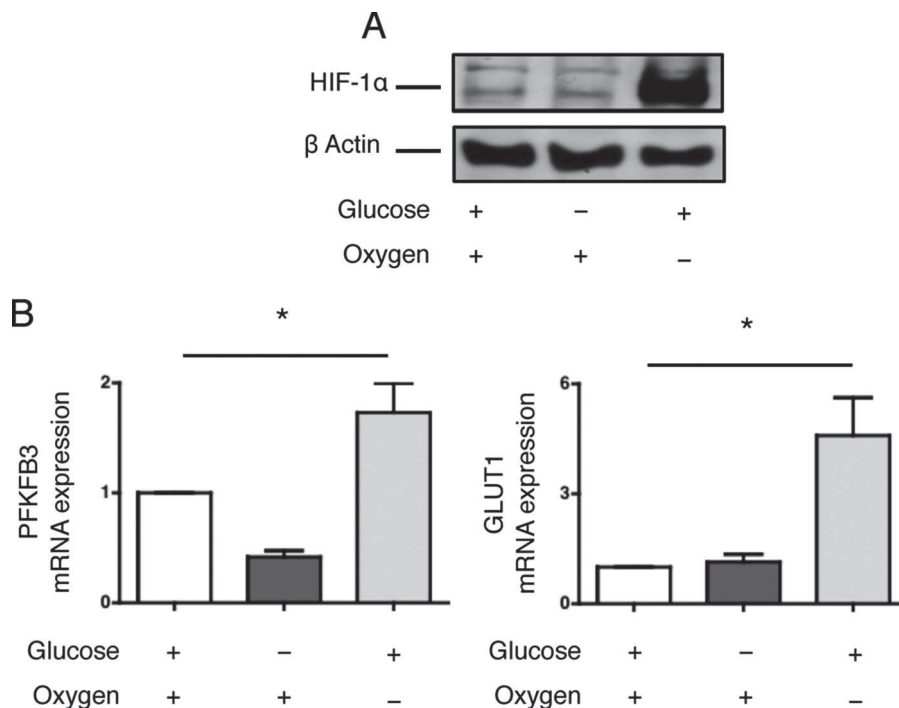


FIGURE 2. Glucose deprivation does not activate HIF-1 α signaling. A, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. HIF-1 α protein expression was determined by immunoblotting. The immunoblot shown is representative of three independent experiments. B, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *PFKFB3* and *GLUT1* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *, $p < 0.05$.

hypoxia, also significantly increased the secretion of bFGF into the culture medium compared with basal culture conditions (Fig. 1B). Glucose starvation induced *ANG* expression at both the transcriptional and protein levels, as did hypoxia (Fig. 1C). *PDGFB* expression did not increase under glucose starvation, whereas hypoxia induced the expression of *PDGFB* transcripts (supplemental Fig. S1, B and C). Overall, our results suggest that the angiogenic factors VEGFA, bFGF, and ANG but not PDGFB, are expressed by HREC in response to glucose deprivation but independently of hypoxia.

Glucose Deprivation Does Not Activate HIF-1 α Signaling—HIF-1 α is a central regulator of the expression of various angiogenic molecules during ischemia (19, 20). We therefore evaluated whether glucose deprivation would activate the HIF-1 α pathway. HIF-1 α did not accumulate in HREC cultured in glucose-deprived medium under a normoxic atmosphere but was elevated under hypoxic conditions (Fig. 2A). Additionally, the expression of genes whose transcription is under control of HIF-1 α , such as 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (*PFKFB3*) and glucose transporter 1 (*GLUT1*), was induced during hypoxia but not under glucose-deprived conditions (Fig. 2B). These results suggest that glucose deprivation does not activate the HIF-1 α signaling pathway and that alternative pathways might be involved in the induction of the expression of angiogenic mediators.

Glucose Deprivation, but Not Hypoxia, Activates the UPR in HREC—The UPR has been identified as an important conveyor of tumoral tissue resistance in response to ischemia (11, 12) and may regulate the expression of VEGFA under chemically induced ER stress (21). Given these findings, we investigated

whether glucose deprivation activates the UPR in HREC. The expression of genes typically activated during the UPR, including glucose-related protein 78 (*GRP78*) and CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein (*CHOP*) was significantly increased during glucose deprivation, as was the spliced form of X-box-binding protein-1 (*XBPI*) (Fig. 3A). These genes were not expressed when HREC were cultured under hypoxic conditions, suggesting that glucose deprivation, but not hypoxia, activates the UPR within renal tubular cells. Moreover, the ER stressor tunicamycin induced the expression of VEGFA, bFGF and ANG, but not *PDGFB* in HREC both at the transcripts and protein levels (Fig. 3, B and C), suggesting that the UPR might promote an angiogenic response in HREC.

RNA Interference Directed against Three Transducers of the UPR—To test whether the UPR modulates the angiogenic response of HREC following glucose deprivation, we inhibited *IRE1 α* , *PERK*, or *ATF6* expression in HREC by siRNA-based RNA interference. The efficacy of *IRE1 α* , *PERK*, or *ATF6* inhibition of expression is depicted in Fig. 4. Glucose deprivation elevates the preferential expression of *IRE1 α* and *ATF6*; however, the biological significance of this result, to our knowledge, is unknown. Given the known models for *IRE1 α* and *ATF6* activation during ER stress, it is unlikely that this positive regulation would interfere with the functions of the UPR.

VEGFA Expression Is Regulated by PERK—We first examined the role of *PERK* in modulating VEGFA expression in response to glucose deprivation. Inhibition of *PERK* expression by RNA interference significantly reduced the expression of VEGFA at both the transcriptional and protein levels (Fig. 5A). Interestingly, HREC exposed to salubrinal, a small molecule

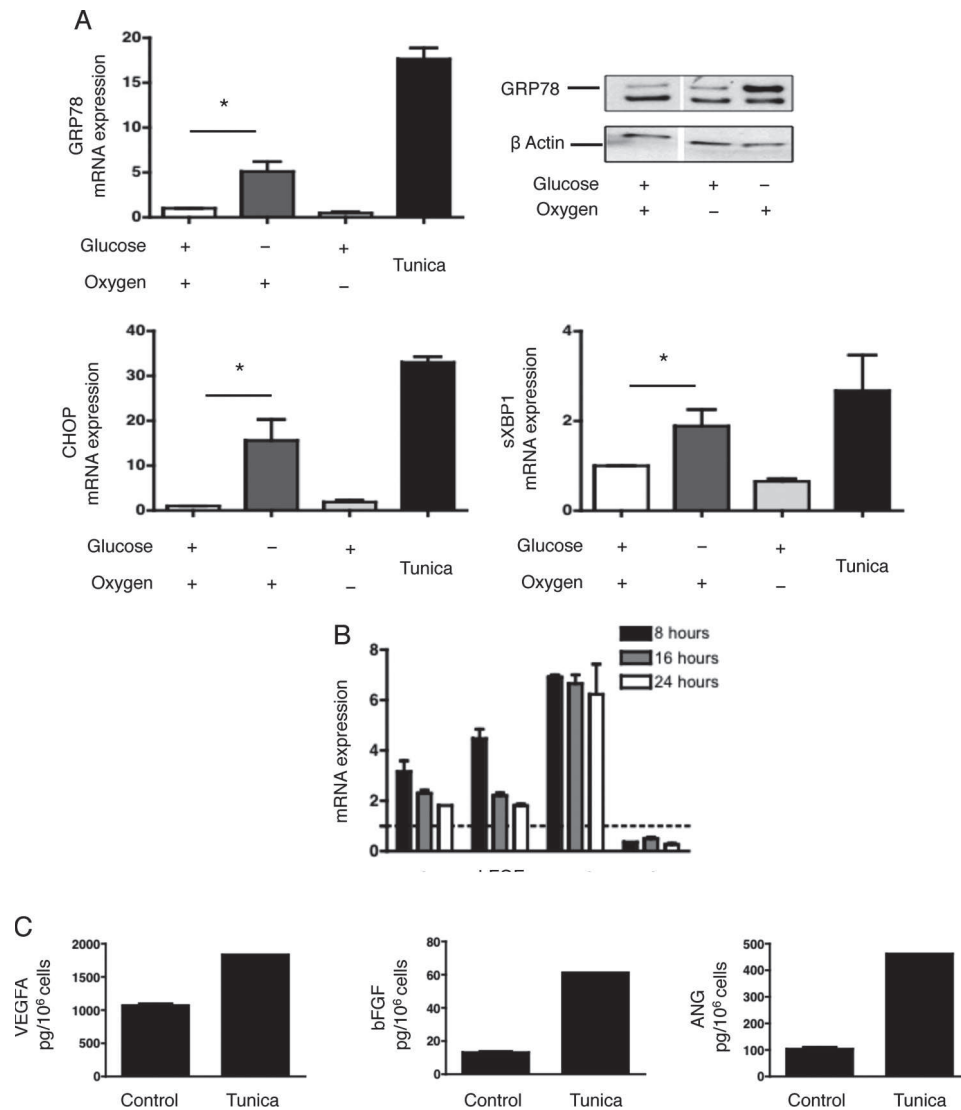


FIGURE 3. Glucose deprivation, not hypoxia, activates the UPR in HREC. A, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h, or with 2.5 μ M tunicamycin for 8 h. GRP78, CHOP, and sXBP1 transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. GRP78 protein expression was determined by immunoblotting. The immunoblot shown is representative of three independent experiments. *, $p < 0.05$. B, HREC were cultured with 2.5 μ M tunicamycin for 8, 16, and 24 h. VEGFA, bFGF, ANG, and PDGFB transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels in non-treated cells in four independent experiments. The dotted line figures the expression level (= 1) of each gene in basal condition. C, HREC were cultured with 2.5 μ M tunicamycin for 16 h, and the secretion of VEGFA, bFGF, and ANG in the medium was quantified by ELISA.

that inhibits eIF2 α dephosphorylation and maintains the PERK-eIF2 α pathway activated (22), increased VEGFA expression (Fig. 5B). Conversely, inhibition of IRE1 α or ATF6 expression did not alter VEGFA expression (Fig. 5, C and D and supplemental Fig. S2, A and B). These results suggest that PERK, but not IRE1 α or ATF6, regulates the expression of VEGFA. However, one cannot exclude that PERK may regulate the intracellular trafficking or secretion of VEGFA in addition to its production.

bFGF Expression Is Regulated by PERK—We next examined the role of the UPR transducers in the production of bFGF in response to glucose deprivation. Inhibition of PERK expression significantly reduced the secretion of bFGF into the culture medium but did not affect transcript levels (Fig. 6A). Salubrinal treatment of HREC led to a significant increase in bFGF secretion without alteration of transcript levels (Fig. 6B). Conversely,

inhibition of IRE1 α or ATF6 expression did not alter bFGF expression (Fig. 6, C and D, and supplemental Fig. S3, A and B). These results suggest that PERK, but not IRE1 α or ATF6, mediates bFGF expression in renal tubular cells during glucose deprivation and that regulation may occur at both the transcriptional and post-transcriptional levels.

ANG Expression Is Regulated by PERK and IRE1 α —We next focused on the regulation of ANG by the UPR. Inhibition of PERK expression significantly increased ANG expression at both the transcriptional and protein levels (Fig. 7A), whereas salubrinal strongly inhibited it (Fig. 7B), suggesting that PERK signaling inhibits ANG expression. Inhibition of IRE1 α expression significantly reduced ANG expression at the transcriptional and protein levels (Fig. 7C), suggesting that IRE1 α activates ANG expression. Inhibition of ATF6 did not alter ANG expression (Fig. 7D and supplemental Fig. S4). Together, these

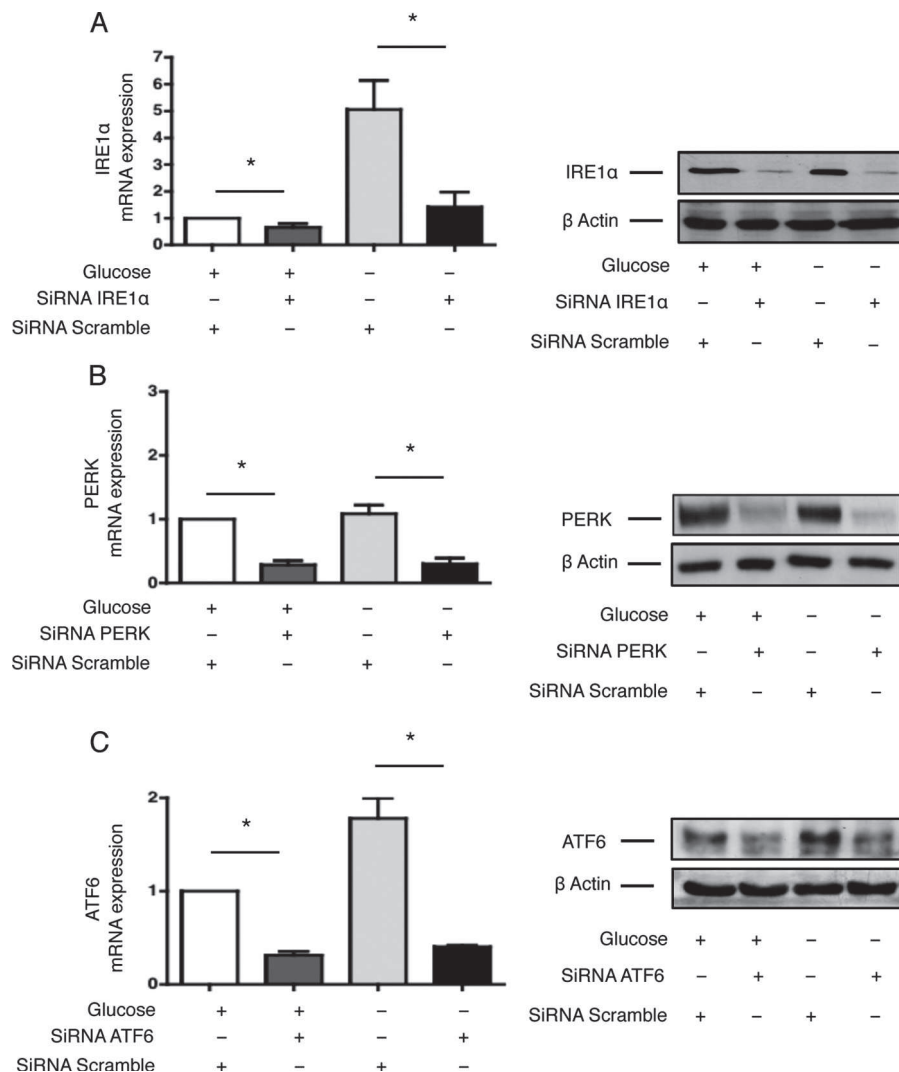


FIGURE 4. RNA interference directed against three transducers of the UPR. A, HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *IRE1α* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. *, $p < 0.05$. B, HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *PERK* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. *, $p < 0.05$. C, HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *ATF6* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. *, $p < 0.05$.

results suggest that *ANG* expression is positively regulated by *IRE1α* and inhibited by *PERK* during glucose deprivation. Given the fact that *ANG* promotes stress-induced translational repression (23), our findings also unravel a new mechanism of inhibition of protein synthesis activated by the UPR. This mechanism seems to occur when the activity of the *PERK*-*eIF2α* pathway is reduced because *ANG* expression is induced when *PERK* expression is inhibited (Fig. 7A) and when the phosphorylation of *eIF2α* is abolished (Fig. 7E).

Cold Ischemia in Rat Kidneys Activates the UPR and Generates an Angiogenic Response—To translate our *in vitro* findings to an *in vivo* setting, we reproduced an ischemic kidney condition and analyzed the UPR and angiogenic responses in rat kidneys. To mimic cold ischemia, which occurs during kidney transplantation, the rats were nephrectomized, and the kidneys were stored in the IGL1® preservative solution at 4 °C for 24 h. The expression of the UPR target genes homocysteine-induc-

ible endoplasmic reticulum stress protein (*HERP*), protein disulfide isomerase, (*PDI*), *CHOP*, *ATF4*, and *sXBP1*, was significantly increased in ischemic rat kidneys (Fig. 8A), the UPR surrogate marker *GRP78* was expressed after 24 h and the *PERK* target *eIF2α* was phosphorylated (Fig. 8B), suggesting that the UPR is activated during acute ischemia of the kidney. We observed that *bFGF*, *VEGFA*, and *ANG* expression increased after 24 h and paralleled the expression of the UPR markers (Fig. 8C), whereas *HIF-1α* was not expressed in ischemic kidneys (Fig. 8D). Together, these results suggest that cold ischemia activates the UPR and that *VEGFA*, *bFGF*, and *ANG* expression also increases in parallel, independently of *HIF-1α* expression.

DISCUSSION

Survival in an ischemic microenvironment requires a cell to activate adaptive biological responses that regulate metabolic

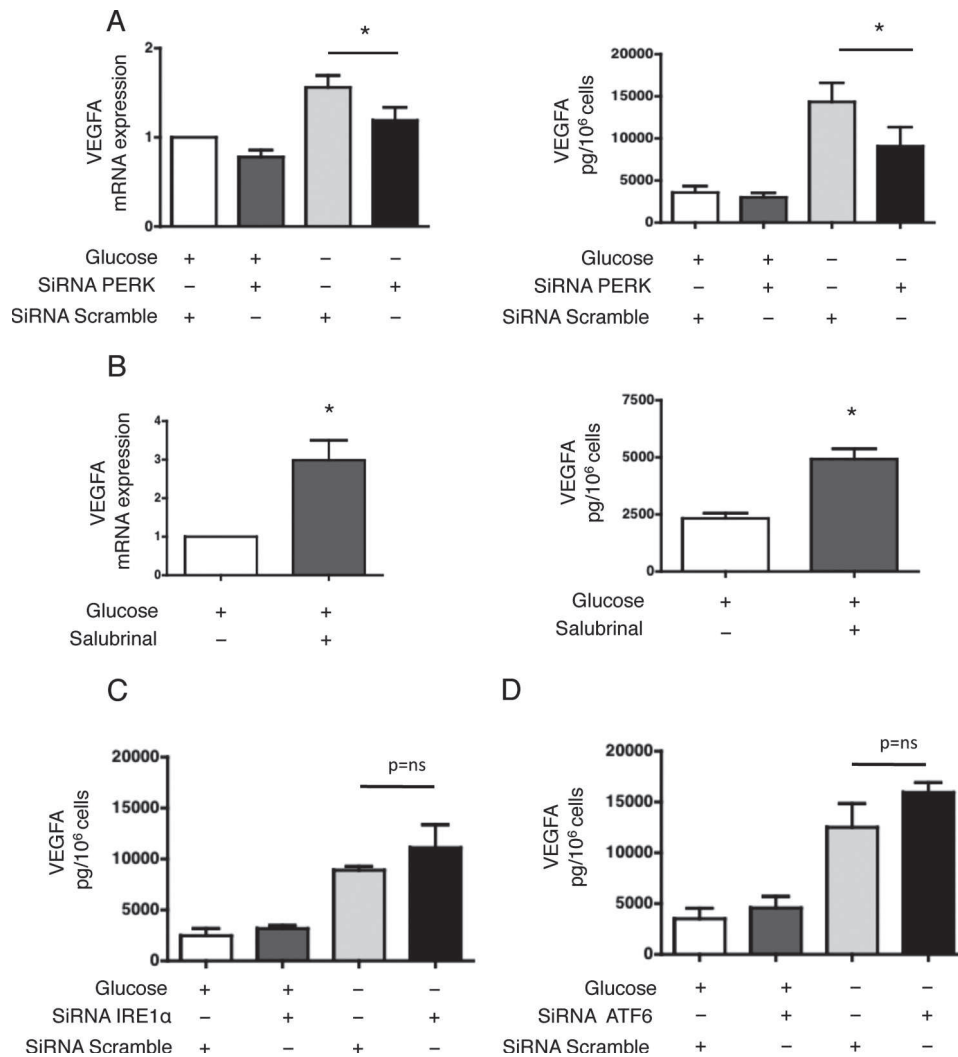


FIGURE 5. VEGFA expression is regulated by PERK. A, HREC were transfected with siRNAs targeting PERK or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Left: VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). Right: secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$. B, HREC were incubated in standard medium and treated with or without 25 μ M salubrinal for 48 h. Left: VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). Right: secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA ($n = 3$). *, $p < 0.05$. C, HREC were transfected with siRNAs targeting IRE1 α or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$. D, HREC were transfected with siRNAs targeting ATF6 or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$.

reprogramming, angiogenesis, translation inhibition, and macroautophagy. The angiogenic response generated by the ischemic kidney epithelium integrates components of these standard responses to ischemic stress to maintain the blood supply and fulfill cell's energetic demands. In addition to the HIF-1 α -mediated transcriptional program that responds to hypoxic stress, other undefined adaptive pathways are also thought to be involved, but their specific functions have not been experimentally confirmed. Here, we describe an adaptive angiogenic response of the human kidney epithelium to nutrient deprivation that functions independently of hypoxia and HIF-1 α . This response links ER stress and the UPR to the production of the angiogenic factors VEGFA, bFGF, and ANG. The fact that PDGFB expression is not altered by the UPR transducers implies that the UPR and HIF-1 α drive angiogenic responses with distinctive profiles. In addition to the regulation of angio-

genesis, our findings reveal a novel function of the UPR in the inhibition of translation. In fact, in our model, ANG, an RNase that inhibits translation in response to stressful conditions, is tightly regulated by the UPR transducers PERK and IRE1 α , and its expression occurs when the PERK-eIF2 α axis activity is abolished.

The observation that nutrient starvation in HREC activates the UPR, which in turn mediates the secretion of angiogenic factors, adds complexity to the consequences of ER stress in the progression of kidney disease. The secretion of angiogenesis mediators, such as VEGFA, in response to ischemia is essential for the maintenance of the tubulo-interstitial compartment, as it prevents endothelial cell death and peritubular capillary collapse, and helps to maintain adequate oxygen and nutrient supplies (24–26). Angiogenic mediators, however, also fuel inadequate tissue remodeling because they can facilitate leukocyte

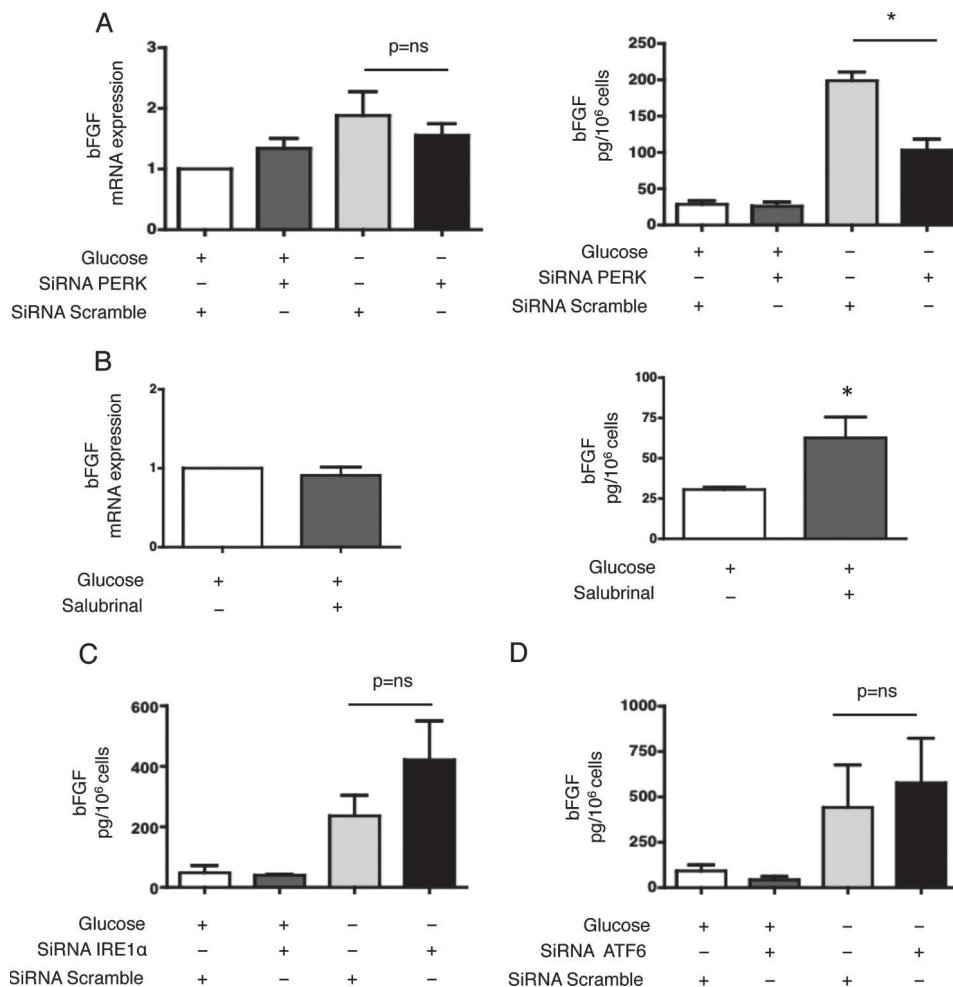


FIGURE 6. bFGF expression is regulated by PERK. A, HREC were transfected with siRNAs targeting PERK or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Left: bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 48 h and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 4$). Right: secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$. B, HREC were incubated in glucose-free or standard medium and treated with or without 25 μ M salubrinal for 48 h. Left: bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). Right: secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA ($n = 3$). *, $p < 0.05$. C, HREC were transfected with siRNAs targeting IRE1 α or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). D, HREC were transfected with siRNAs targeting ATF6 or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$).

recruitment and promote inflammation, the epithelial-to-mesenchymal transition and fibroblast activation (8, 27, 28). Therapeutic modulation of the UPR with 4-phenyl-butyrate or salubrinal can alleviate the deleterious effects of the UPR, reduce kidney injury and delay tissue remodeling (29, 30). Further studies are required to address important questions regarding the consequences of these angiogenic responses in the context of kidney disease progression as well as the duration of the response, the level of secretion of these mediators and the nature of the initial injury.

To mimic cellular energetic failures that occur in response to ischemia, we analyzed the consequences of glucose starvation on human epithelial cells. Glucose starvation induces intracellular ATP depletion and serves as a relevant model of ischemic stress (31). Tissue ischemia, which promotes profound nutrient deprivation, including glucose deprivation, results in an energetic failure that may induce ER stress. Ischemia in rat kidneys is a far more complex process than glucose deprivation in cultured cells, and this difference is a limitation of *in vitro* models

for the study of ischemia. As an example of this limitation, the combination of glucose starvation with hypoxia (which commonly occurs during tissue ischemia) was too toxic to be suitable for further studies *in vitro* (32). Our *in vitro* model used glucose starvation to induce the energetic failure that may occur during ischemia *in vivo*. Because our aim was to investigate the HIF-1 α -independent involvement of the UPR in the angiogenic response to ischemia, we did not include hypoxia in our model, as it would not have been possible to delineate the respective contributions of HIF-1 α signaling and the UPR. This model enabled us to characterize the role of the UPR transducers in generating an angiogenic response to energetic failure that is independent of HIF-1 α .

Our findings highlight the central and complex involvement of the PERK kinase in the modulation of the angiogenic response to glucose deprivation. PERK phosphorylates the translational regulator eIF2 α , resulting in a general inhibition of translation. One factor that escapes translational inhibition is the transcription factor ATF4, which regulates the expression

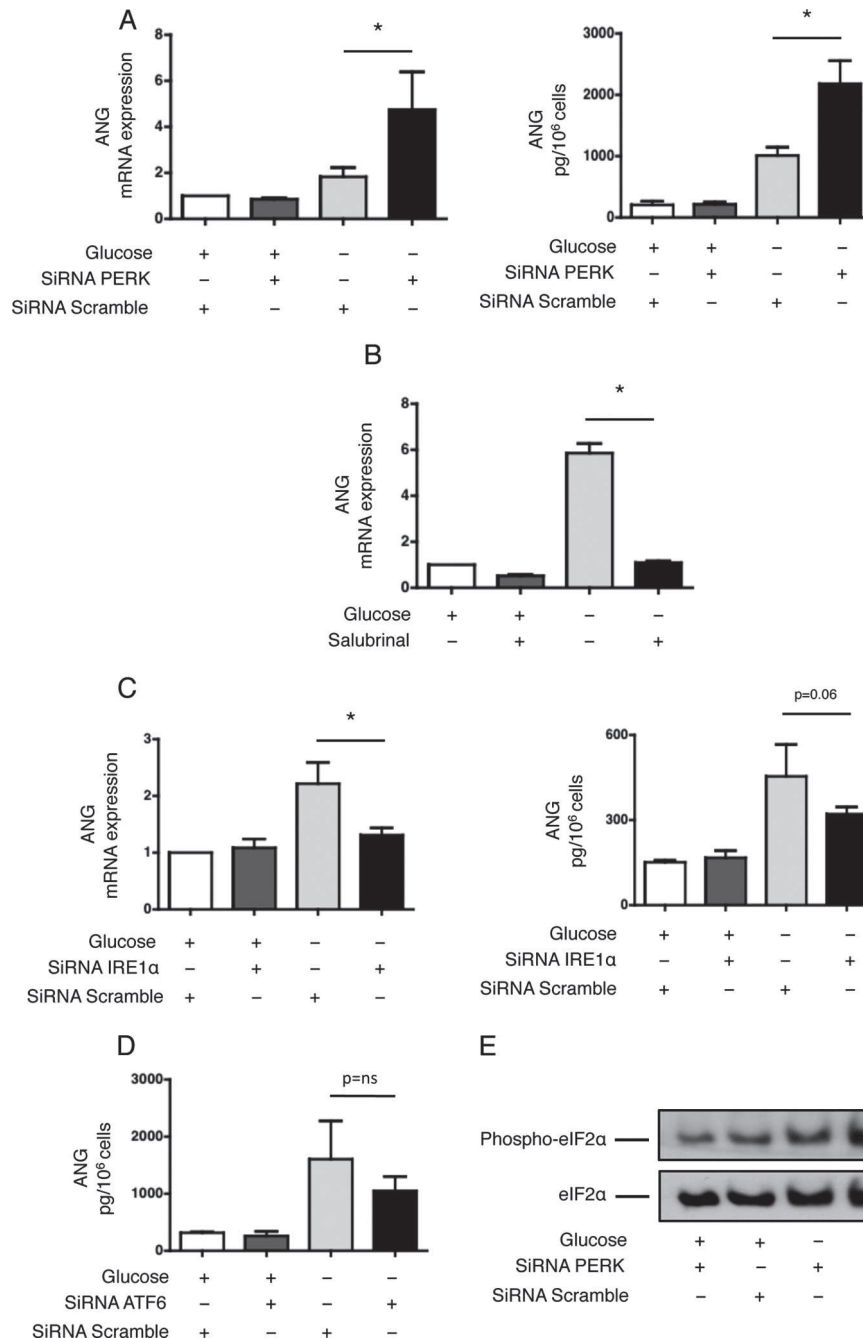


FIGURE 7. ANG expression is regulated by PERK and IRE1 α . HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left*: ANG transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right*: secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$. *B*, HREC were incubated in glucose-free or standard medium and treated with or without 25 μ M salubrinal for 48 h. *Left*: ANG transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). *Right*: secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *C*, HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left*: ANG transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right*: secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *D*, HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *E*, phosphorylation status of eIF2 α . HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Phospho-eIF2 α and eIF2 α protein levels were measured after the cells had incubated in glucose-free or standard medium ($n = 4$). A representative immunoblot is shown.

of nutrient transporters and antioxidants, amino acid synthesis and the induction of autophagy (11, 31, 33). The mode of regulation of *VEGFA* expression by UPR mediators seems to depend on the cell type and the identity of ER stress factor. In mouse embryonic fibroblasts, *VEGFA* is transcriptionally regulated by

IRE1 α and PERK through their respective transcription factors, sXBP1 and ATF4, but in the HepG2 hepatoma cell line, *VEGFA* is regulated by ATF6 (21). A more complex regulation of *VEGFA* was observed in a medulloblastoma cell line, involving regulatory action at both the transcriptional and post-trans-

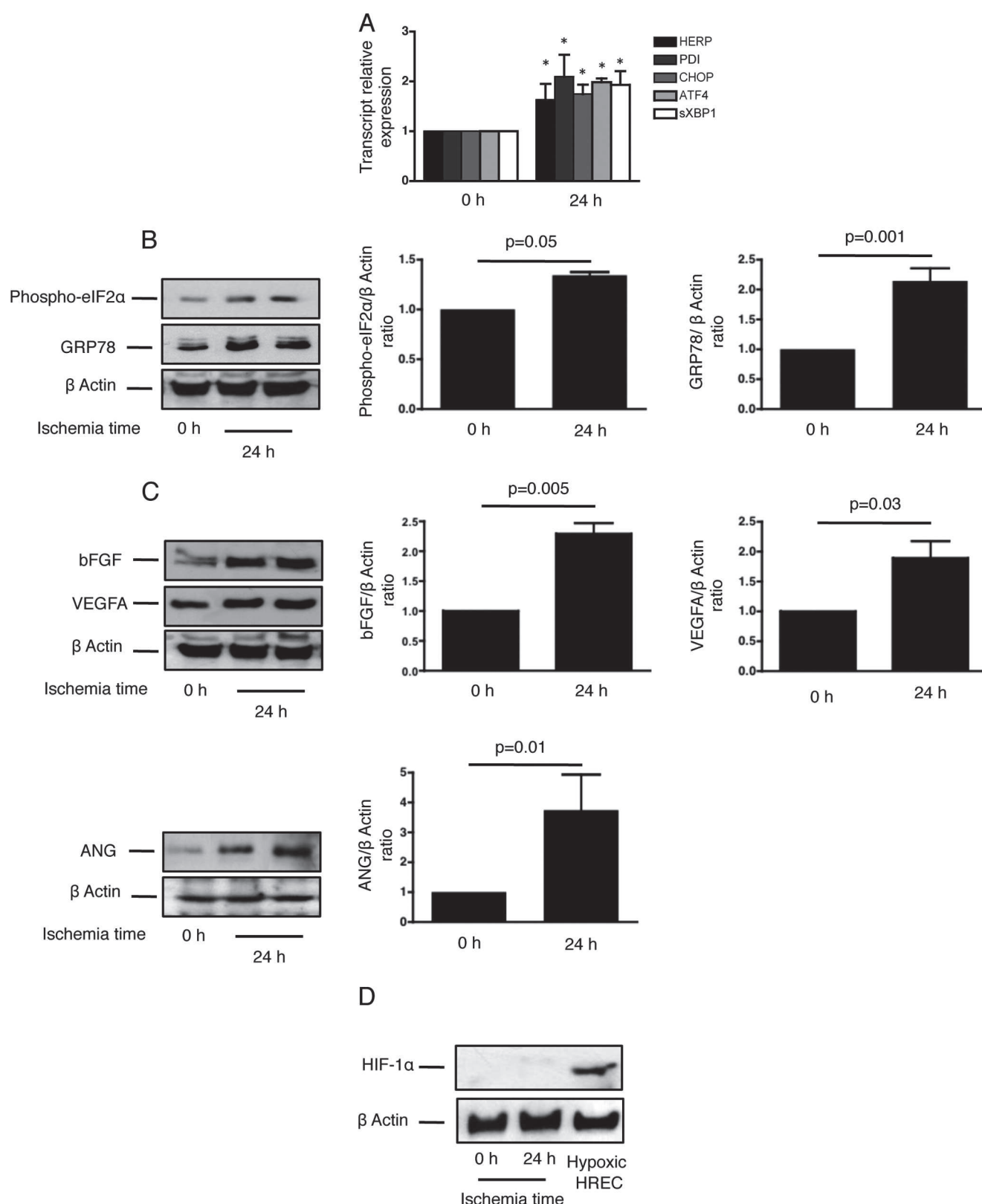


FIGURE 8. Cold ischemia in rat kidneys activates ER stress and generates an angiogenic response. The rats were nephrectomized, and the kidneys were rinsed and incubated in an IGL1® solution for 24 h. *A*, *HERP*, *PDI*, *CHOP*, *ATF4*, and *sXBP1* transcript levels were measured by qRT-PCR in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia, and compared with levels in non ischemic kidneys ($n = 4$). *, $p < 0.05$. *B*, GRP78 and phospho-eIF2α protein levels were measured in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia. *Left*: a representative immunoblot is shown. *Right*: a densitometric analysis of immunoblots. $n = 4$. *C*, VEGFA, bFGF, and ANG protein levels were measured in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia. *Left*: a representative immunoblot is shown. *Right*: a densitometric analysis of immunoblots. $n = 4$. *D*, HIF-1α protein levels were measured in rat kidneys after 24 h of cold ischemia. A representative immunoblot is shown. Hypoxic HREC were used as control.

scriptional levels (34). In our model, *VEGFA* expression depends only on PERK. Moreover, a salubrin-induced increase in the activity of this pathway resulted in increased expression of *VEGFA*. Therefore, PERK might represent a potential therapeutic target for increasing *VEGFA* production. PERK also regulates *bFGF* expression at both the transcriptional and translational levels. The fact that salubrin increases *bFGF* secretion and the inhibition of the PERK pathway reduces *bFGF* secretion without modifying transcript expression suggest that the UPR might activate *bFGF* secretion independently of a transcriptional activity. *bFGF* lacks the signal peptide and is secreted through a non-conventional pathway that does not involve the trans-Golgi network (35). Instead, *bFGF* secretion requires activation by caspase 1 within inflammasomes, followed by direct release from the cell through the plasma membrane (36). Recently, ER stress was shown to activate a non-conventional secretion pathway mediated by Golgi reassembly stacking proteins (GRASPs) (37). Other modes of non-conventional secretion, including autophagy, may be involved in *bFGF* secretion when the UPR is activated. PERK is known to activate autophagy (38), and autophagy is implicated in the non-conventional secretion of various molecules, including interleukin 1 β (39), which is secreted in the same way as *bFGF* (36). Whether *bFGF* is secreted during the UPR through a similar non-conventional secretion pathway is an interesting hypothesis that remains to be tested.

Our results also show that the UPR regulates *ANG* expression, a finding of considerable biological significance. In addition to its functions in kidney vasculogenesis (17), *ANG* is a general inhibitor of translation in response to stress. *ANG* is a secreted ribonuclease that generates stress-induced tRNA-derived fragments (tiRNAs) that contribute to the displacement of eIF4G/A from capped and uncapped mRNA and eIF4E/G/A (eIF4F) from the m7G cap, thereby inhibiting translation and inducing stress granule assembly (23). Our results suggest that, in addition to the activation of PERK and the phosphorylation of eIF2 α , the UPR activates an *ANG*-mediated pathway that may lead to a global repression of translation. Validation of this hypothesis will require in-depth studies to precisely delineate the respective roles of *ANG*-induced stress-induced tiRNAs and eIF2 α phosphorylation in the inhibition of translational programs during the UPR.

In conclusion, nutrient deprivation in human epithelial cells promotes an angiogenic response that involves *VEGFA*, *bFGF*, and *ANG* secretion. This process occurs independently of HIF-1 α , with PERK acting as a central regulator, making it a promising therapeutic target. Additionally, the expression of *ANG*, a stress-induced translational repressor, is modulated by both IRE1 α and PERK, representing an alternate pathway by which the UPR might inhibit protein synthesis in response to stress.

REFERENCES

1. Racusen, L. C., and Regele, H. (2010) *Kidney Int. Suppl.*, S27–S32
2. Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1819–1834
3. Mimura, I., and Nangaku, M. (2010) The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 667–678
4. Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Lusi, A. J., Binder, B. R., and Bochkov, V. N. (2008) ATF4-de-

- pendent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood* **112**, 330–339
5. Fine, L. G., and Norman, J. T. (2008) *Kidney Int.*
 6. Majmundar, A. J., Wong, W. J., and Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* **40**, 294–309
 7. Chade, A. R. (2011) Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R783–R790
 8. Mayer, G. (2011) Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **26**, 1132–1137
 9. Wouters, B. G., and Koritzinsky, M. (2008) Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 851–864
 10. Sengupta, S., Peterson, T. R., and Sabatini, D. M. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **40**, 310–322
 11. Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B. G., and Koumenis, C. (2005) ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* **24**, 3470–3481
 12. Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D. T., Bouchecareilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R. J., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* **67**, 6700–6707
 13. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 89–102
 14. Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086
 15. Pallet, N., Thervet, E., Le Corre, D., Knebelmann, B., Nusbaum, P., Tomkiewicz, C., Meria, P., Flinois, J. P., Beaune, P., Legendre, C., and Anglicheau, D. (2005) Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int.* **67**, 2422–2433
 16. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402–408
 17. Nakamura, M., Yamabe, H., Osawa, H., Nakamura, N., Shimada, M., Kumasaka, R., Murakami, R., Fujita, T., Osanai, T., and Okumura, K. (2006) Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**, 1489–1495
 18. Rajnoch, J., Loderova, A., Szabo, A., Honsova, E., Vannay, A., Bloudickova, S., Matl, I., and Viklicky, O. (2005) Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus. *Transplant Proc.* **37**, 352–354
 19. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2009) Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* **16**, 167–179
 20. Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009) Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab.* **9**, 11–22
 21. Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., and Urano, F. (2010) Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One* **5**, e9575
 22. Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D., and Yuan, J. (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935–939
 23. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., and Anderson, P. (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell* **43**, 613–623
 24. Leonard, E. C., Friedrich, J. L., and Basile, D. P. (2008) VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F1648–F1657
 25. Choi, Y. J., Chakraborty, S., Nguyen, V., Nguyen, C., Kim, B. K., Shim, S. I., Suki, W. N., and Truong, L. D. (2000) Peritubular capillary loss is associ-

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

- ated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Hum. Pathol.* **31**, 1491–1497
26. Rudnicki, M., Perco, P., Enrich, J., Eder, S., Heininger, D., Bernthaler, A., Wiesinger, M., Sarközi, R., Noppert, S. J., Schramek, H., Mayer, B., Oberbauer, R., and Mayer, G. (2009) Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab. Invest.* **89**, 337–346
27. Reinders, M. E., Rabelink, T. J., and Briscoe, D. M. (2006) Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 932–942
28. Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F. N., Yang, C. Q., Kalluri, R., Müller, G. A., and Neilson, E. G. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **61**, 1714–1728
29. Inoki, K., Mori, H., Wang, J., Suzuki, T., Hong, S., Yoshida, S., Blattner, S. M., Ikenoue, T., Rüegg, M. A., Hall, M. N., Kwiatkowski, D. J., Rastaldi, M. P., Huber, T. B., Kretzler, M., Holzman, L. B., Wiggins, R. C., and Guan, K. L. (2011) mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2181–2196
30. Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallab, A., Rabant, M., Flinois, J. P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2008) Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant* **8**, 2283–2296
31. Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010) The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* **29**, 2082–2096
32. Marjon, P. L., Bobrovnikova-Marjon, E. V., and Abcouwer, S. F. (2004) Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cancer* **3**, 4
33. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293
34. Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., and Hendershot, L. M. (2010) *PLoS One* **5**,
35. Florkiewicz, R. Z., Majack, R. A., Buechler, R. D., and Florkiewicz, E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* **162**, 388–399
36. Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., and Beer, H. D. (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831
37. Gee, H. Y., Noh, S. H., Tang, B. L., Kim, K. H., and Lee, M. G. (2011) Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* **146**, 746–760
38. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293
39. Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* **30**, 4701–4711

Supplemental table 1. Primer sequences used for RT-PCR analysis

Gene name	Access number	PCR product size (nucleotides)	Primer sequence
ANG	NM_001145 (<i>Homo sapiens</i>)	191	F 5'-tgtcctgccggttctgcgg-3' R 5'-ccggccctgtggttgcat-3'
ATF6	NM_007348 (<i>Homo sapiens</i>)	232	F 5'-ccagcagcacccaagactcaaaca-3' R 5'-gtgtgactccccagcaacagc-3'
bFGF	NM_002006 (<i>Homo sapiens</i>)	221	F 5'-agcgaccctcacatcaag-3' R 5'-cgttcagtgccacatacc-3'
CHOP	NM_004083 (<i>Homo sapiens</i>)	170	F 5'-tggaagcctggtatgaggac-3' R 5'-tgtgacctctgctggttctg-3'
GLUT1	NM_006516 (<i>Homo sapiens</i>)	291	F 5'-gctacaacactggagtcac-3' R 5'-ggatcagcatctcaaaggac-3'
GRP78	NM_005347 (<i>Homo sapiens</i>)	200	F 5'-ggtgaaagacccctgacaaa-3' R 5'-gtcaggcgattctggtcatt-3'
IRE1 α	NM_001433 (<i>Homo sapiens</i>)	237	F 5'-agagaggcgggagagccgtg-3' R 5'-cgaggagggtgggggaagcga-3'
PDGF-B	NM_002608 (<i>Homo sapiens</i>)	116	F 5'-ccgccagcgccattttca-3' R 5'-ctttcagcgaggctggaggg-3'
PERK	NM_004836 (<i>Homo sapiens</i>)	175	F 5'-caggcaaggaaggagtctg-3' R 5'-aacaactccaaagccaccac-3'
PFKFB3	NM_004566 (<i>Homo sapiens</i>)	253	F 5'-ggtgtgcgacgaccctac-3' R 5'-gtacacgatcggtctctg-3'
RPL13A	NM_012423 (<i>Homo sapiens</i>)	124	F 5'-cctggaggagaagaggaaagaga-3' R 5'-gaggacctctgtgtattgtcaa-3'
VEGF-A	NM_001171623 (<i>Homo sapiens</i>)	144	F 5'-gaaggaggaggcagaatc-3' R 5'-cacacaggatggcttgaag-3'
sXBP1	NM_005080 (<i>Homo sapiens</i>)	117	F 5'-gcagggtcaggcccagttgt-3' R 5'-tgggtccaagttgtccagaatgc-3'
ATF4	NM_024403 (<i>Rattus norvegicus</i>)	206	F 5'-acagcgaagtgttggcgggg-3' R 5'-ggcatcctcctgcccgtgt-3'
CHOP	NM_024134 (<i>Rattus norvegicus</i>)	236	F 5'-cgacagagccaaaataacagc-3' R 5'-ggatgcagggtcaagagtgtg-3'
HERP	NM_053523 (<i>Rattus norvegicus</i>)	110	F 5'-agaacttcggatgaatgc-3' R 5'-gaggaaaacggaaaatgtcg-3'
PDI	NM_012998 (<i>Rattus norvegicus</i>)	206	F 5'-tgaactggctgaagaaacg-3' R 5'-ggaaaacacatcgctattgg-3'
sXBP1	NM_001004210 (<i>Rattus norvegicus</i>)	158	F 5'-ctgagtcgcgagcaggtgcag-3' R 5'-ctctggggaaggacatttga-3'

Supplemental table 2. Primary antibodies used for Western blot.

Antibody	Dilution	Reference
Anti-β Actin	1:1000	A2668 ¹
Anti-Angiogenin	1 :500	sc-9044 ²
Anti-ATF6	4 μ g/ml	IMG-273 ³
Anti-bFGF	1:500	05-118 ⁴
Anti-eIF2α	1 :1000	ab5369 ⁵
Anti-phospho-eIF2α	1:500	ab32157 ⁵
Anti-GRP78	1:1000	sc-1050 ²
Anti-HIF-1α	1:500	NB100-449 ⁶
Anti-IRE1α	1:500	3294 ⁷
Anti-PERK	1:500	3192 ⁷
Anti-VEGFA	1:500	sc-152 ²

¹ Sigma-Aldrich

² Santa Cruz Biotechnology

³ Imgenex

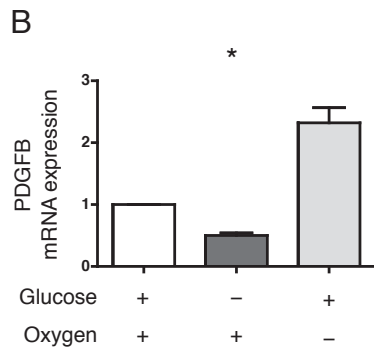
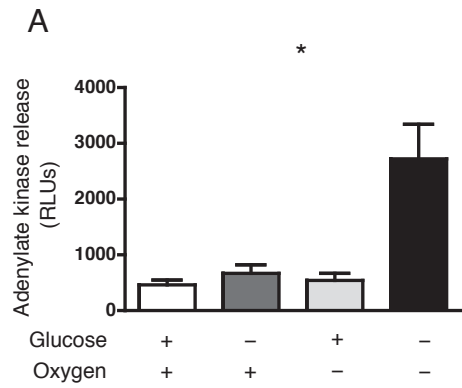
⁴ Millipore

⁵ Abcam

⁶ Novus Biologicals

⁷ Cell Signaling Technology

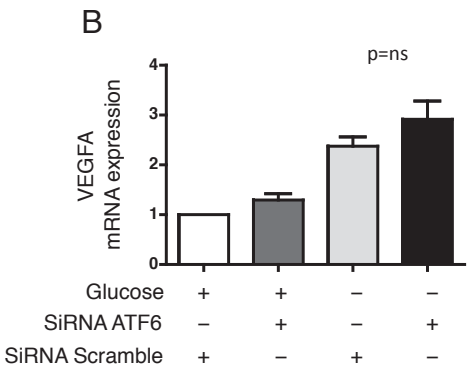
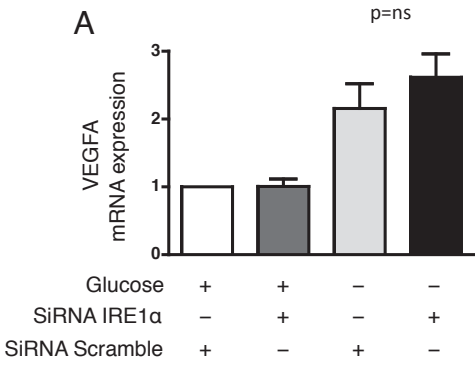
Supplemental Figure 1



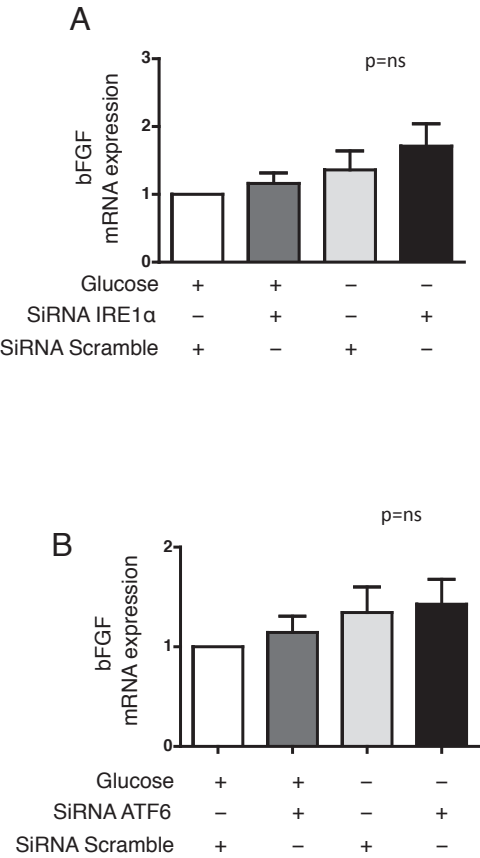
C

Standard PDGF-BB concentration (pg/ml)	Corresponding optical density	Conditions (n=4)	Optical density (mean±se)	Corresponding concentration
0	0.04	Glucose (+) Oxygen (+)	0.03±0.004	<Min
31.2	0.07	Glucose (-) Oxygen (+)	0.03±0.001	<Min
62.5	0.11	Glucose (+) Oxygen (-)	0.03±0.001	<Min
125	0.19	Glucose (-) Oxygen (-)	0.03±0.006	<Min
250	0.34			
500	0.63			
1000	1.33			
2000	2.45			

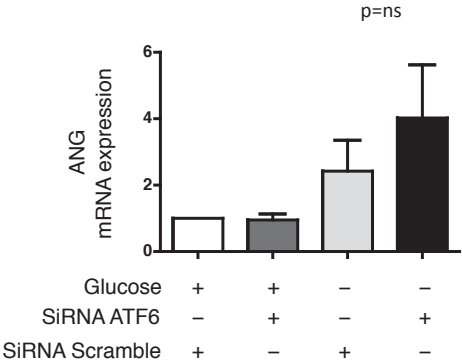
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. A. HREC were cultured in glucose-deprived or standard medium with or without hypoxia for 24 hours. The level of cell death was evaluated by measuring the release of adenylate kinase with the ToxiLight® BioAssay Kit. Adenylate kinase concentrations were estimated by the luminescence of the medium and are presented as the mean \pm sem of three independent experiments. B. HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 hours. *PDGFB* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm sem relative to levels after 24 hours of culture with standard conditions in four independent experiments. *, $p<0.05$. C. The secretion of PDGF-BB in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm sem of four independent experiments. *, $p<0.05$.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2. A. HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. A. *VEGFA* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4). B. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *VEGFA* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 48 hours and compared to levels after 48 hours of culture with standard conditions (n=4).

SUPPLEMENTAL FIGURE 3. A. HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *bFGF* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4). B. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *bFGF* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4).

SUPPLEMENTAL FIGURE 4. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. *ANG* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4).

Article 3 : La déplétion en tryptophane et la kinase GCN2 sont impliquées dans l'activation de l'autophagie induite par l'interféron γ .

Fougeray S, Mami I, Bertho G, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Pallet N. Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate interferon γ -induced autophagy. *J Immunol*, 2012 (in press).

L'IFN γ interagirait avec l'autophagie, mécanisme protecteur majeur par son activité catabolique et permettant le contrôle de l'immunité innée et adaptative. Le processus par lequel l'IFN γ active l'autophagie dans les cellules humaines n'est pas bien connu et l'activation de l'autophagie par l'IFN γ est peu étudiée dans le rein.

L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence le mécanisme conduisant à l'activation de l'autophagie en réponse à l'IFN γ dans les cellules tubulaires rénales et d'étudier les conséquences sur l'inflammation de l'induction de l'autophagie induite par l'IFN γ .

Nous avons montré que l'IFN γ entraîne l'accumulation de compartiments acides cytoplasmiques caractéristiques des lysosomes, de la protéine LC3-II et de vésicules à double membrane spécifiques des autophagosomes montrant que l'IFN γ entraîne la formation d'autophagosomes et d'autolysosomes. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases lysosomales montre que l'IFN γ augmente le flux autophagique. Le tryptophane (Trp) est métabolisé suite à l'induction de l'indoléamine 2,3-dioxygénase par l'IFN γ . La déplétion en Trp active la protéine kinase GCN2 et conduit à la phosphorylation de eIF2 α , un activateur de l'autophagie. Au contraire, la supplémentation en Trp réduit l'activation de GCN2-eIF2 α et inhibe l'autophagie. De la même façon, l'inhibition de GCN2 par des ARN interférences bloque le processus autophagique induit par l'IFN γ suggérant que l'activation de l'autophagie en réponse à l'IFN γ est médiée par la déplétion en tryptophane et est associée, en partie, à l'activation de la voie GCN2/eIF2 α . Enfin, l'inhibition de l'autophagie par l'utilisation de siRNA dirigés contre *Beclin-1* amplifie la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et fibrogéniques montrant que l'autophagie induite en réponse à l'IFN γ est capable de réduire la sécrétion de ces médiateurs par les cellules tubulaires rénales humaines.

En conclusion, nous avons identifié un nouveau mécanisme par lequel l'IFN γ active l'autophagie et nous avons démontré que l'autophagie module la réponse immune induite par l'IFN γ dans les cellules tubulaires rénales humaines.

<http://www.jimmunol.org/content/189/6/2954.full>

Etude 1 : Le stress du réticulum endoplasmique dans la maladie rénale associée à la mutation de UMOD : une étude de cas chez l'humain.

Adam J, Bollée G, **Fougeray S**, Noël LH, Antignac C, Knebelman B, Pallet N. Endoplasmic reticulum stress in UMOD-related kidney disease: a human pathologic study. *Am J Kidney Dis*, 59: 117-121, 2012.

Les mutations du gène *UMOD* codant l'uromoduline, une protéine produite par les cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé et excrétée dans les urines, conduisent au développement de néphrites tubulo-interstitielles (NTI). Dans des conditions normales, l'uromoduline est distribuée au niveau de la membrane apicale des cellules tubulaires de la branche ascendante de l'anse de Henlé et une partie des tubules contournés distaux. La mutation du gène *UMOD* entraîne la production d'une protéine mal conformée qui est retenue dans la lumière du RE. L'accumulation de la protéine mutée peut induire un stress du RE.

L'objectif de cette étude a été d'établir un lien entre l'accumulation d'uromoduline mutée dans les cellules tubulaires épithéliales et le stress du RE.

Nous avons comparé des biopsies rénales de deux groupes de patients. Le premier groupe est constitué de 7 patients, nommés « patients *UMOD* », dont le diagnostic de la maladie rénale associée à *UMOD* a été effectué sur la base de la présence d'une NTI familiale et porteurs d'une mutation sur le gène *UMOD*. Le second groupe est formé de 5 patients, appelés « patients NTI familiale », présentant les mêmes caractéristiques cliniques que les patients *UMOD* mais ne portant pas de mutation sur le gène *UMOD*.

Nous avons montré, à partir de biopsies de patients *UMOD*, que l'expression de l'uromoduline est hétérogène, intense et localisée dans le cytoplasme des cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Dans ces mêmes tubules, l'expression périnucléaire du marqueur du stress du RE, GRP78, est augmentée. Au contraire, dans les biopsies de patients présentant une NTI familiale non associée à une mutation du gène

UMOD, le marquage de l'uromoduline met en évidence une expression apicale normale de la protéine et celui de GRP78 ne montre pas d'augmentation de cette protéine chaperonne.

En conclusion, ces données montrent pour la première fois que l'accumulation de l'uromoduline mutée peut entraîner un stress du RE dans les cellules tubulaires rénales suggérant que le stress du RE est potentiellement impliqué dans la progression des maladies rénales associées à la mutation de *UMOD*.

Endoplasmic Reticulum Stress in *UMOD*-Related Kidney Disease: A Human Pathologic Study

Julien Adam, MD,¹ Guillaume Bollée, MD, PhD,² Sophie Fougeray, PhD,³
Laure-Hélène Noël, MD,³ Corinne Antignac, MD, PhD,^{4,5,6}
Bertrand Knebelman, MD, PhD,² and Nicolas Pallet, MD, PhD^{3,7}

Mutations of the *UMOD* gene, which encodes the uromodulin protein, are associated with tubulointerstitial nephritis and hyperuricemia. *UMOD* mutations impair uromodulin folding, resulting in its retention within the endoplasmic reticulum (ER) of renal tubular cells. The aim of this study was to investigate whether mutant uromodulin accumulation in epithelial tubular cells is associated with ER stress. We characterized tubular expression of uromodulin and the ER stress surrogate marker Grp78 by immunohistochemistry in kidney biopsy specimens from 7 patients with *UMOD*-related kidney disease. We compared this population with 5 patients with familial tubulointerstitial nephritis not related to *UMOD* mutation. All biopsy specimens from patients carrying the *UMOD* mutation showed strong heterogeneous cytoplasmic expression of uromodulin in cells of the thick ascending limb of the loop of Henle. In the same tubules, Grp78 was highly expressed in a perinuclear pattern. In contrast, in all kidney biopsy specimens from patients without *UMOD* mutations, uromodulin staining showed normal apical expression and Grp78 expression was not increased. Our observations support the hypothesis that ER accumulation of mutant uromodulin may cause ER stress, providing a potential mechanism for the progression of *UMOD*-related kidney disease.

Am J Kidney Dis. 59(1):117-121. © 2011 by the National Kidney Foundation, Inc.

INDEX WORDS: *UMOD*; endoplasmic reticulum stress; kidney; unfolded protein response; uromodulin; Tamm-Horsfall.

Mutations in *UMOD*, the gene that encodes uromodulin, are associated with tubulointerstitial nephritis (TIN) of autosomal dominant inheritance.¹ *UMOD*-related kidney diseases are characterized by the association of TIN with focal tubular atrophy and interstitial fibrosis. Although uromodulin usually is distributed at the apical membrane of the tubular cells lining the thick ascending limb of the loop of Henle and early distal convoluted tubules,²⁻⁴ immunohistology of *UMOD*-related kidney disease specimens shows an intense heterogeneous staining pattern for uromodulin in the cytoplasm.^{1,5} The mutated *UMOD* gene produces misfolded uromodulin, which cannot be exported out of the endoplasmic reticulum (ER) and remains retained inside the lumen of the ER.⁶⁻⁸ Thus, the accumulation of mutated uromodulin could produce ER stress. ER stress results from the accumulation of misfolded proteins within the ER lumen and activates an adaptive response termed the “unfolded protein response.”⁹⁻¹¹ The unfolded protein response generates cell death and dedifferentiation and also triggers microenvironmental inflammation that could contribute to the pathogenesis of *UMOD*-related kidney diseases.⁹

The aim of our study was to investigate whether tubular ER stress could be detected in kidney biopsy specimens from patients with *UMOD*-related kidney disease. Our immunohistologic study compared tubular expression of the ER stress marker Grp78 (also known as heat shock 70 kDa protein 5; encoded by the

HSPA5 gene) between a population of patients with *UMOD*-related kidney disease and a control population of patients with hereditary TIN not related to *UMOD* mutations. To our knowledge, our data are the first to show in humans that tubular ER stress is activated during *UMOD*-related kidney disease.

CASE REPORT

We retrospectively reviewed all cases of patients screened for *UMOD* mutations at Necker Hospital in Paris, France. We examined kidney biopsy specimens from 7 patients, hereafter referred to as *UMOD* patients. The diagnosis of *UMOD*-related kidney disease was made on the basis of familial TIN with hyperuricemia and/or precocious gout. A definitive diagnosis was confirmed by

From the ¹Service d'Anatomopathologie, Paris, France and ²Service de Néphrologie, Hôpital Necker et Université Paris Descartes; ³INSERM U775 et Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères; ⁴INSERM U983, Hôpital Necker-Enfants Malades; ⁵Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes; ⁶Département de Génétique, Centre de Référence MARHEA, Hôpital Necker-Enfants Malades, APHP; and ⁷Service de Transplantation Rénale, Hôpital Necker et Université Paris Descartes, Paris, France.

Received April 25, 2011. Accepted in revised form August 9, 2011. Originally published online October 7, 2011.

Address correspondence to Nicolas Pallet, MD, PhD, Unité INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères, 45, rue des saints Pères, 75006 Paris, France. E-mail: nicolas.pallet@parisdescartes.fr

© 2011 by the National Kidney Foundation, Inc.

0272-6386/\$36.00

doi:10.1053/j.ajkd.2011.08.014

genotyping for mutations in the *UMOD* gene. Informed consent was obtained from the affected patients, and this study was approved by the ethics committee of our institution. Genomic DNA was isolated from peripheral-blood leukocytes by standard procedures. All exons covering *UMOD* (10 coding exons) and *HNF1B* (hepatic nuclear factor 1 β) coding regions were amplified by polymerase chain reaction for direct sequencing; mutations identified are listed in Table S1 (available as online supplementary material). The control population, referred to as familial TIN patients, included 5 patients with clinical features and a familial history similar to those with *UMOD* mutations and for whom a biopsy showed TIN. *UMOD* gene sequencing, which was performed in all these patients, found no mutations.

Clinical and biological characteristics of the 2 groups of patients were similar (Table 1). In normal and familial TIN kidneys, uromodulin was distributed in cells found in the thick ascending limb of the loop of Henle, with a staining pattern characteristic of apical membrane reactivity and that shows weak diffuse cytoplasmic localization (Fig S1). In patients with *UMOD*-related kidney disease, uromodulin was expressed mainly in the cytoplasm with dense perinuclear aggregates and was expressed weakly at the apical membrane (Figs S1 and S2).

As a measure of ER stress, we characterized tubular expression of Grp78 in *UMOD* and familial TIN patients by immunohistochemistry (Fig 1). Grp78 is an ER-resident chaperone and serves as a master regulator and surrogate marker of ER stress.¹¹⁻¹³ Grp78 was overexpressed in tubules expressing uromodulin and not in the distal part of the tubule, as shown by the lack of colocalization between aquaporin 2 and Grp78 (Fig 1). These results suggest that the specificity of Grp78 for diseased (in relation to *UMOD* muta-

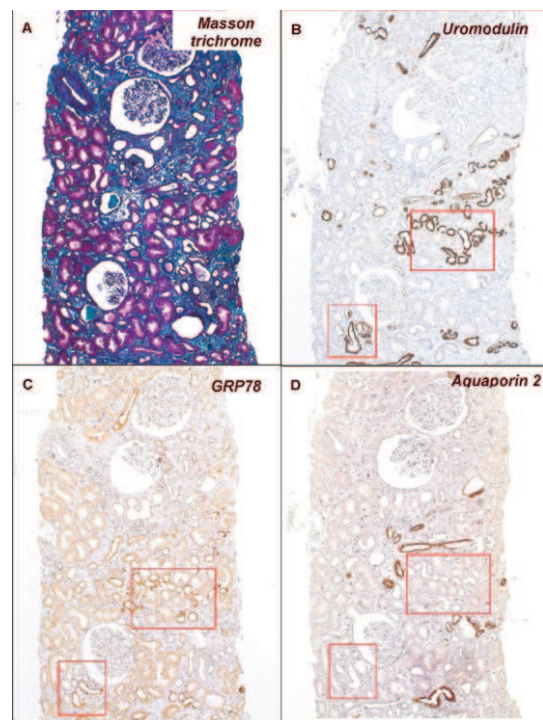


Figure 1. Representative kidney biopsy specimen and immunohistochemistry from a *UMOD* mutation patient. (A) Biopsy specimen shows interstitial fibrosis and tubular atrophy. (B, C) Serial sections show misfolded uromodulin aggregates in tubules also stained with the endoplasmic reticulum stress marker Grp78. Primary antibody for uromodulin was a sheep polyclonal (Millipore, www.millipore.com) used at 1:3,000, and for Grp78, a goat polyclonal (Santa Cruz Biotechnology, www.scbt.com) used at 1:500. (D) Of note, tubules expressing Grp78 do not stain the distal tubule marker aquaporin 2 (primary antibody, rabbit polyclonal used at 1:1000; Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com). Red boxes highlight representative fields showing colocalization of uromodulin and GRP78. (Original magnification, $\times 10$.)

Table 1. Patient Characteristics

	<i>UMOD</i> Patients	Familial TIN Patients	
		<i>HNF1B</i> Mutation	No Mutation
No. of patients/families	7/7	1/1	4/4
Age (y)	30 (11; 54)	34	40 (26; 63)
Male sex	5 (71.5)	0	3 (75)
Familial history of kidney disease	6 (85)	1	4 (100)
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	44 (31; 72)	52	51 (7; 77)
Proteinuria (mg/d)	0.1 (0; 0.5)	0.15	0.1 (0; 0.3)
Gout and hyperuricemia			
Gout	6 (85)	1	3 (75)
Hyperuricemia	7 (100)	0	4 (100)
Uricemia (μ mol/L)	522 (455; 680)	372	500 (470; 580)
Renal cysts	2 (29)	1	1 (25)
Bilateral	1 (14.5)	1	1 (25)
Unilateral	1 (14.5)	0	0 (0)

Note: Continuous variables are expressed as mean (25th; 75th percentile); categorical variables, as number (percentage). eGFR calculated by the Modification of Diet in Renal Disease Study equation. Conversion factor for units: eGFR in mL/min/1.73 m² to mL/s/1.73 m², $\times 0.01667$.

Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; *HNF1B*, hepatic nuclear factor 1 β ; TIN, tubulointerstitial nephritis; *UMOD*, uromodulin.

tion) tubules is high. In a few tubules, there is a lack of colocalization of uromodulin and Grp78, which might occur because ER stress and GRP78 expression are dynamic processes; this implies that the accumulation of misfolded uromodulin in the ER is not permanently associated with Grp78 overexpression.

Biopsy specimens of *UMOD*-related kidney disease show strong perinuclear staining of Grp78, which is compatible with overexpression of this protein inside the ER. Familial TIN biopsy specimens did not show tubular staining, suggesting that ER stress is absent from tubules of patients with familial TIN (Fig 2). Grp78 staining and uromodulin aggregates are colocalized on serial cuts, showing that ER stress occurs in the thick ascending limb of the loop of Henle, where mutated uromodulin forms aggregates. When we compared semiquantitative counts of Grp78 tubular expression, 0.58% of tubules were positively stained with Grp78 in the familial TIN group compared with 18.6% in the *UMOD* group ($P = 0.001$; Fig 3).

Taken together, these results provide evidence that the ER stress marker Grp78 is expressed in tubular cells of the thick ascending limb of the loop of Henle in the setting of *UMOD*-related kidney disease. Grp78 overexpression is associated with the accumulation of uromodulin aggregates within the ER, suggesting that the intratubular accumulation of misfolded uromodulin in the tubular cell promotes ER stress.

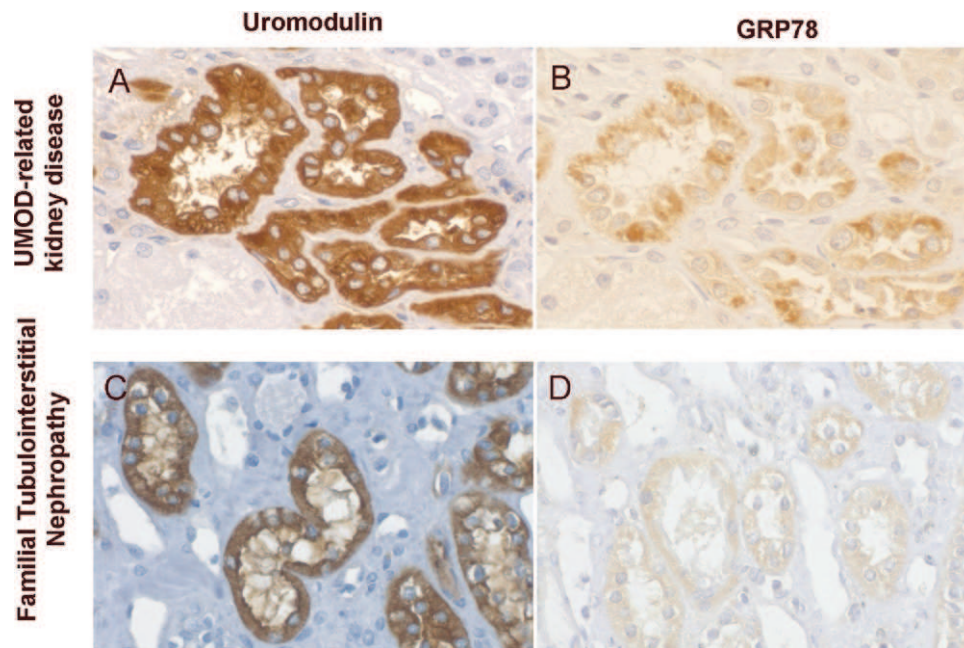


Figure 2. Comparison of uromodulin-Grp78 colocalization in *UMOD*-related kidney disease and familial tubulointerstitial nephritis (TIN). (A, B) In patients with *UMOD* mutations, serial sections show that tubules in which misfolded uromodulin aggregates show strong perinuclear Grp78 immunoreactivity. (C, D) In patients with familial TIN, no significant staining for Grp78 was observed. (Original magnification, $\times 20$.)

DISCUSSION

Mutations in *UMOD* are responsible for *UMOD*-related kidney diseases, a group of autosomal dominant chronic interstitial diseases that includes familial juvenile hyperuricemic nephropathy and medullary cystic kidney disease type 2.^{1,5,14-18} Moreover, common genetic variants of *UMOD* might lessen kidney function.^{19,20} These data suggest that uromodulin, for which the precise physiologic function is unknown, is

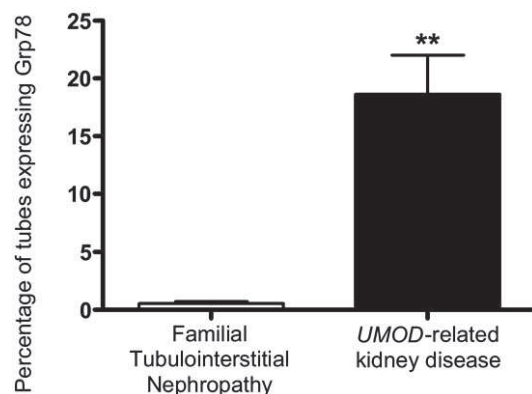


Figure 3. Quantification of tubular Grp78 staining in *UMOD*-related kidney disease biopsy specimens compared with those of familial tubulointerstitial nephropathy (TIN) not related to *UMOD* mutation ($n = 7$ for the *UMOD* group and $n = 5$ for the familial TIN group); $**P < 0.01$. Error bars represent standard error. Tubular Grp78 staining was quantified by dividing the number of positive tubules by the total quantified at original magnification, $\times 20$.

implicated in the development of chronic kidney diseases.

More than 40 *UMOD* mutations have been described to date, and most involve substitution of cysteine residues or highly conserved polar amino acids. Such missense mutations would be expected to change disulfide bond formation and thereby interfere with correct folding and spatial flexibility. The resultant misfolded proteins are retained inside the ER lumen. Although this has been shown clearly in experimental studies, the biological pathways activated after the accumulation of misfolded uromodulin inside the ER are unknown. One can speculate that ER stress and the unfolded protein response are activated and promote tubular cell death and local inflammation. The unfolded protein response is an adaptive response to ER stress that is highly conserved among different species and comprises 3 distinct phases: an adaptive phase, an alarm phase, and an activation phase. The adaptive phase is characterized by proteasomal degradation of proteins, global inhibition of translation, and an increase in number of chaperones and protein-processing enzymes. The alarm phase involves the generation of an inflammatory response mediated by NF- κ B (nuclear factor- κ B) and JNK (c-Jun N-terminal kinase) activation. Finally, if stress is prolonged or its intensity becomes too high, the unfolded protein response may induce cell death by apoptosis. Many disturbances, including cellular redox dysregulation, disruption of calcium ion regulation, glucose

deprivation, viral infections, abnormal glycosylation patterns, inhibition of folding enzymes, and overloading of cholesterol, can lead to the buildup of unfolded or misfolded proteins in the ER lumen.^{9,10,13}

The kidney parenchyma is the target of numerous chemical and physical stresses that activate various responses in all cell types. ER stress has been described in various kidney injuries in both experimental and clinical studies,^{12,21-27} including ischemia-reperfusion injury; cyclosporine, cisplatin, and aminoglycoside nephrotoxicity; and the setting of various glomerulonephritides. The importance of ER stress in the development of tubulointerstitial lesions recently was highlighted by the observation that age-related chronic tubulointerstitial lesions appear more rapidly in Grp78 mutant mice compared with wild-type mice.²⁸ In this model, the induction of massive proteinuria accelerated the development of chronic nephropathy, leading to the activation of caspase 12 and tubular apoptosis.

Protein misfolding is an important contributor to a wide spectrum of genetic diseases.²⁹ For example, protein misfolding disorders constitute an emerging group of diseases, mostly neurodegenerative, that are characterized by the presence of abnormal protein aggregates that contain specific misfolded proteins. Our results show a strong correlation between genotype (*UMOD* mutation) and phenotype; namely, the cytoplasmic accumulation of uromodulin aggregates in *UMOD*-related kidney disease.

Our data are consistent with previous experimental work that showed that mutated uromodulin accumulates in the ER lumen and promotes cellular death and tissue injury.^{6,8} This suggests that *UMOD*-related kidney diseases may constitute the first kidney protein misfolding disorder described.

In conclusion, we show that abnormal uromodulin expression in epithelial cells of the thick ascending limb of the loop of Henle is associated with upregulation of expression of the ER stress marker Grp78 in patients with *UMOD*-related kidney disease. This suggests that ER stress may have a role in the pathogenesis of *UMOD*-related kidney disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Support: None.

Financial Disclosure: The authors declare that they have no relevant financial interests.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1: Mutation characteristics.

Figure S1: Comparison of uromodulin staining in *UMOD*-related kidney disease, normal kidney, and familial tubulointerstitial nephropathy.

Figure S2: Uromodulin immunohistology and periodic acid-Schiff staining of *UMOD*-related kidney disease biopsy sections.

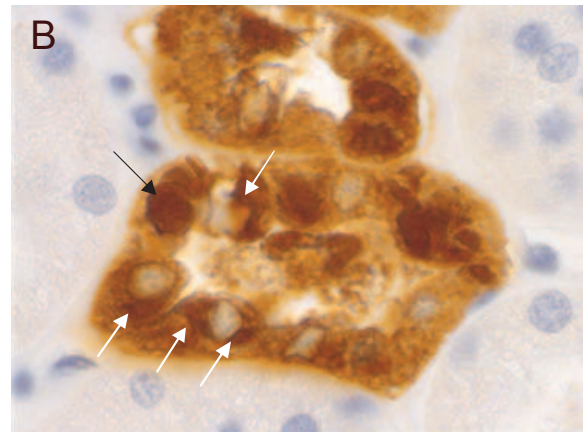
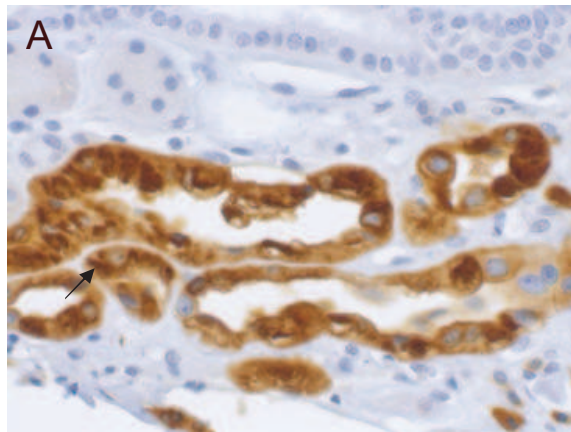
Note: The supplementary material accompanying this article (doi:10.1053/j.ajkd.2011.08.014) is available at www.ajkd.org

REFERENCES

1. Bleyer AJ, Hart PS. UMOD-associated kidney disease. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, eds. *GeneReviews* [internet]. Seattle, WA: University of Washington; 2011:NBK1356.
2. Bachmann S, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry*. 1985;83(6):531-538.
3. Kumar S, Jasani B, Hunt JS, Moffat DB, Asscher AW. A system for accurate immunolocalization of Tamm-Horsfall protein in renal biopsies. *Histochem J*. 1985;17(11):1251-1258.
4. Peach RJ, Day WA, Ellingsen PJ, McGiven AR. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall protein in human kidney using immunogold electron microscopy. *Histochem J*. 1988;20(3):156-164.
5. Rezende-Lima W, Parreira KS, Garcia-Gonzalez M, Riveira E, Banet JF, Lens XM. Homozygosity for uromodulin disorders: FJHN and MCKD-type 2. *Kidney Int*. 2004;66(2):558-563.
6. Bernascone I, Janas S, Ikehata M, et al. A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum Mol Genet*. 2010;19(15):2998-3010.
7. Jennings P, Aydin S, Kotanko P, et al. Membrane targeting and secretion of mutant uromodulin in familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(1):264-273.
8. Williams SE, Reed AA, Galvanovskis J, et al. Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet*. 2009;18(16):2963-2974.
9. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455-462.
10. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004;279(25):25935-25938.
11. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000;101(5):451-454.
12. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Khadir A, Liu J, Peng H. Complement C5b-9 membrane attack complex increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in glomerular epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(44):41342-41351.
13. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-529.
14. Bleyer AJ, Hart TC. Medullary cystic kidney disease type 2 [letter]. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(6):1142; author reply 1142-1143.
15. Wolff M, Young S, Beck B, et al. Leadership in a public housing community. *J Health Commun*. 2004;9(2):119-126.
16. Rampoldi L, Caridi G, Santon D, et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet*. 2003;12(24):3369-3384.
17. Dahan K, Devuyst O, Smaers M, et al. A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(11):2883-2893.
18. Schaffer P, Gombos E, Meichelbeck K, Kiss A, Hart PS, Bleyer AJ. Childhood course of renal insufficiency in a family with a uromodulin gene mutation. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(7):1355-1360.
19. Gudbjartsson DF, Holm H, Indridason OS, et al. Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones—role of age and comorbid diseases. *PLoS Genet*. 2010;6(7):e1001039.
20. Kottgen A, Glazer NL, Dehghan A, et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet*. 2009;41(6):712-717.

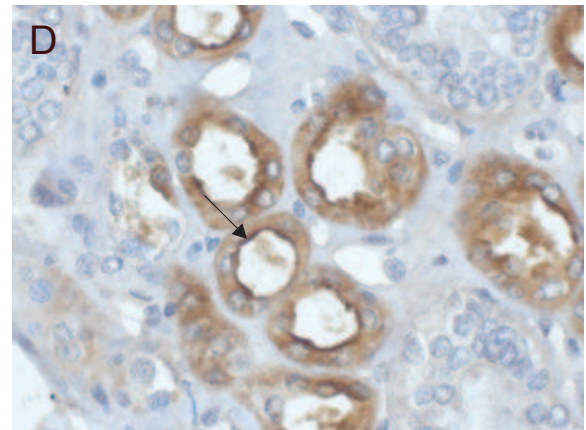
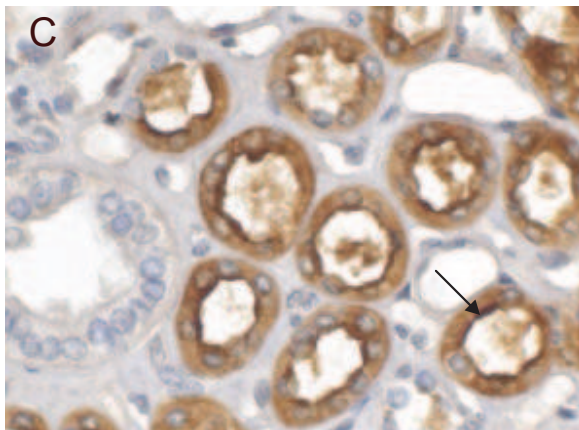
21. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Bijian K. Role of the endoplasmic reticulum unfolded protein response in glomerular epithelial cell injury. *J Biol Chem*. 2005;280(26):24396-24403.
22. Hiramatsu N, Kasai A, Du S, et al. Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute exposure to heavy metal: evidence from transgenic sensor mice. *FEBS Lett*. 2007;581(10):2055-2059.
23. Inagi R, Nangaku M, Onogi H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int*. 2005;68(6):2639-2650.
24. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress in the kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2008;12(5):317-325.
25. Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Ikehata M, et al. Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(11):2225-2236.
26. Lorz C, Justo P, Sanz A, Subira D, Egido J, Ortiz A. Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(2):380-389.
27. Pallet N, Bouvier N, Bendjallab A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant*. 2008;8(11):2283-2296.
28. Kimura K, Jin H, Ogawa M, Aoe T. Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(4):1048-1053.
29. Galleguillos D, Matus S, Valenzuela V. Targeting endoplasmic reticulum stress pathways to treat neurological disorders associated with protein misfolding. In: Hetz C, ed. *Protein Misfolding Disorders: A Trip Into the ER*. Vol 1. Oak Park, IL: Bentham Science Publishers Ltd; 2010:1-18.

UMOD-related kidney disease



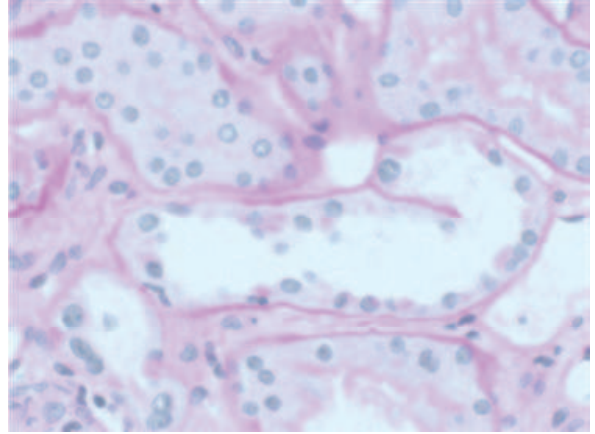
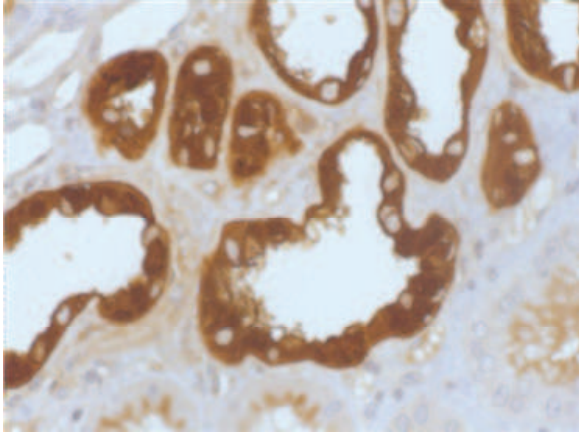
Normal Kidney

Familial Tubulointerstitial Nephropathy



In patients with a *UMOD* gene mutation (**a, b**), cytoplasmic granular aggregates of stained material are observed (**a, arrow**). Cytoplasmic aggregates are mainly perinuclear (**b, white arrows**). In patients with familial tubulointerstitial nephropathy without a *UMOD* mutation (**d**), cytoplasmic staining is weaker, and no granular aggregates are observed. Apical reactivity (**d, arrow**) is usually strong, which is a pattern similar to that of normal kidneys (**c**). Magnification x40, except (**b**), which is x100.

UMOD-related kidney disease



In periodic acid schiff stained sections, rare cytoplasmic granular aggregates of stained material can be observed. Magnification x40.

Table S1. Mutation Characteristics.

No. of cases	Gene mutated	Exon	Nucleotide change	Effect on coding sequence	References
2	UMOD	4	c.449G>C	p.C150S	Rampoldi et al 2003
1	UMOD	4	c.509G>A	p.C170Y	Dahan et al 2003
1	UMOD	4	c.552G>C	p.W184C	novel
1	UMOD	4	c.554G>A	p.R185H	novel
1	UMOD	4	c.674C>T	p.T225M	Rampoldi et al 2003
1	UMOD	5	c.891T>G	p.C297W	Schaffer et al 2010
1	HNF1B (Familial TIN group)	5	1046-294_1206+704del	G349_M402del	

Rampoldi L, Caridi G, Santon D, et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3369-3384.

Dahan K, Devuyt O, Smaers M, et al. A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(11):2883-2893.

Schaffer P, Gombos E, Meichelbeck K, Kiss A, Hart PS, Bleyer AJ. Childhood course of renal insufficiency in a family with a uromodulin gene mutation. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(7):1355-1360.

Etude 2 : Dysfonction des cellules NK dans le diabète de type 2 : implication possible du stress du réticulum endoplasmique.

Berrou J, **Fougeray S**, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Toubert A, Péraldi MN. Natural Killer cell dysfunction in type 2 diabetes: possible involvement of endoplasmic reticulum stress (soumis).

Les patients diabétiques de type 2 sont plus sensibles aux infections et ont une prédisposition plus importante à la survenue de certains cancers. Les mécanismes impliqués dans la dérégulation de la réponse immune des patients atteints de diabète de type 2 sont peu connus. Le stress oxydatif et le stress du RE induits par un taux élevé de glucose pourraient influencer la fonction des cellules de l'immunité et notamment des cellules NK. L'activité des cellules NK est régulée par des récepteurs tels que NKp46 et NKG2D, qui lient des ligands présents à la surface des cellules infectées ou tumorales.

L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence l'implication du stress du RE dans la dysfonction des cellules NK chez les patients diabétiques de type 2.

Notre étude a inclus 51 patients diabétiques de type 2 et 54 patients sains. Nous avons, en premier lieu, observé une diminution significative de l'expression des récepteurs NKG2D et NKp46 à la surface des cellules NK de patients diabétiques de type 2 par rapport aux cellules NK de patients sains. Dans un deuxième temps, nous avons noté une diminution significative de l'expression des ARNm de NKp46 dans les cellules NK de patients diabétiques de type 2 mais pas de modification de l'expression des transcrits de NKG2D. Nous avons également montré que la tunicamycine induit un stress du RE et active la réponse UPR dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patients sains simultanément à une diminution de l'expression de NKG2D. Enfin, nous avons observé l'augmentation des transcrits de *BiP*, *PDI* et *XBPI* dans les PBMC des patients diabétiques de type 2 par rapport aux PBMC des patients sains, suggérant que l'atténuation de l'expression de NKG2D est associée au stress du RE dans les cellules NK des patients diabétiques de type 2.

En conclusion, la diminution de la fonction des cellules NK des patients diabétiques due à la réduction des récepteurs NKp46 et NKG2D peut être liée en partie à un stress du RE.

Natural Killer cell dysfunction in type 2 diabetes: possible involvement of endoplasmic reticulum stress.

Jeannig Berrou^{1,4}, Sophie Fougeray⁵, Marion Venot¹, Victor Chardiny¹, Jean-François Gautier^{3,6}, Antoine Toubert^{1,3,4}, Marie-Noëlle Peraldi^{1,2,3}.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 940, Paris, France;

²Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Louis, Nephrology unit Paris, France ;

³Université Paris 7- Denis Diderot, Paris, France;

⁴AP-HP, Hôpital Saint-Louis Centre d'Investigations Biomédicales "H-O-G", Paris, France;

⁵INSERM U775, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France ;

⁶AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Endocrinology unit Paris, France.

Keywords: human, NK cell, type 2 diabetes, NKG2D receptor, NKp46 receptor, endoplasmic reticulum stress

Article 4 (revue) : Le stress du réticulum endoplasmique : un acteur méconnu dans la transplantation d'organes solides.

Pallet N, **Fougeray S**, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D. Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation*, 88: 605-613, 2009.

Le stress du RE est activé secondairement à une accumulation de protéines mal conformées dans le RE et peut induire la différenciation voire la mort des cellules. Des données récentes suggèrent son implication dans la médiation des lésions de l'organe transplanté. Dans cette revue sont résumés les mécanismes du stress du RE et son implication dans la survenue des lésions du greffon est discutée. L'amélioration des connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires des lésions aiguës et chroniques du transplant peuvent permettre le développement de nouveaux biomarqueurs et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pour empêcher la dysfonction du greffon et favoriser la régénération après des dommages tissulaires.

Endoplasmic Reticulum Stress: An Unrecognized Actor in Solid Organ Transplantation

Nicolas Pallet,^{1,3} Sophie Fougeray,¹ Philippe Beaune,¹ Christophe Legendre,² Eric Thervet,^{1,2} and Dany Anglicheau^{1,2}

Endoplasmic reticulum (ER) stress is an adaptive response to the accumulation of misfolded proteins within the ER, which can trigger cell dedifferentiation and cell suicide. Increasing evidences suggest its implication in mediating allograft injury. Herein, we summarize the mechanisms of ER stress and discuss its implication in allograft injury. Increasing our understanding of the cellular and molecular mechanisms of acute and chronic allograft damages could lead to the development of new biomarkers and to the discovery of new therapeutic strategies to prevent the initiation of graft dysfunction or to promote the tissue regeneration after injury.

Keywords: Transplantation, Endoplasmic reticulum stress, Allograft injury, Epithelial mesenchymal transition.

(*Transplantation* 2009;88: 605–613)

Endoplasmic reticulum (ER) stress results from the accumulation of misfolded proteins within the ER. Cells subject to ER stress activate an evolutionary conserved adaptive response termed the unfolded protein response (UPR). When adaptation fails, excessive and prolonged ER stress triggers cell suicide. Important roles for ER-initiated cell death pathways have been recognized for several diseases, including diabetes, hypoxia, ischemia/reperfusion injury, neurodegenerative, and heart diseases (1).

The implication of the ER stress is not well recognized in solid organ transplantation, but increasing evidences suggest its implication in mediating allograft injury. The purpose of this review is to summarize the mechanisms of ER stress and to discuss its implication during tissue injury in solid organ transplantation. We will also discuss the possible implications of the ER stress in the modifications of cell functional properties and phenotypic changes.

Pathophysiology of Protein Folding in the ER

The ER is a membranous labyrinth network that extends through the cytoplasm of the cell and is contiguous with the nuclear envelope. The ER provides an oxidative environment that is optimized for protein maturation. If this maturation process fails, the protein is not transported to its final

destination and is eventually degraded (2). The ER is rich in Ca^{2+} dependant chaperones, such as immunoglobulin binding protein (BiP), also known as glucose related protein 78 (GRP78), GRP94 and calreticulin, which not only stabilize protein folding intermediates but also sense and dispatch any improperly folded protein for degradation (1, 3).

Many disturbances, including cellular redox dysregulation, aberrant Ca^{2+} regulation, glucose deprivation, viral infection, altered glycosylation, inhibition of folding enzymes, and overloading of cholesterol, can interfere with the ER protein folding machinery and subsequently lead to accumulation of misfolded proteins in the ER lumen, a situation called ER stress.

Mediators of the UPR Signaling

Three major mediators are involved in the UPR signaling: PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) and ATF6 (activated transcription factor 6) (Fig. 1). The most immediate response to the ER stress is transient attenuation of mRNA translation by increased phosphorylation of eIF2 α (elongation initiation factor 2 α) by the ER resident kinase PERK. When phosphorylated, eIF2 α prevents the formation of the ternary translation initiation complex and inhibits mRNA translation (1). Interestingly, eIF2 α allows the selective translation of some mRNAs, such as the transcriptional factor ATF4, carrying in their 5' untranslated region upstream open reading frames sequences, which normally inhibit translation, but which can induce translation in response to eIF2 α activation (1). ATF4 transcriptionally regulates *CHOP* (C/EBP homologous protein) gene expression, whose target is growth arrest and DNA damage inducible protein 34 (GADD34), a mediator of ER stress-induced cell death.

The UPR alters the transcriptional programs through the protein kinase/endoribonuclease IRE1 and the transcriptional factor ATF6. IRE is activated by oligodimerization and autophosphorylation, which promotes the cleavage of the

The authors declare no conflict of interest.

¹ INSERM U775 and Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France.

² Service de Transplantation Rénale, Hôpital Necker, Paris, France.

³ Address Correspondence to: Nicolas Pallet, M.D., Ph.D., Unité INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères, 45, rue des saints Pères, 75006 Paris, France.

E-mail: nicolas.pallet@univ-paris5.fr

Received 26 January 2009. Revision requested 20 February 2009.

Accepted 2 June 2009.

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/09/8805-605

DOI: 10.1097/TP.0b013e3181b22cec

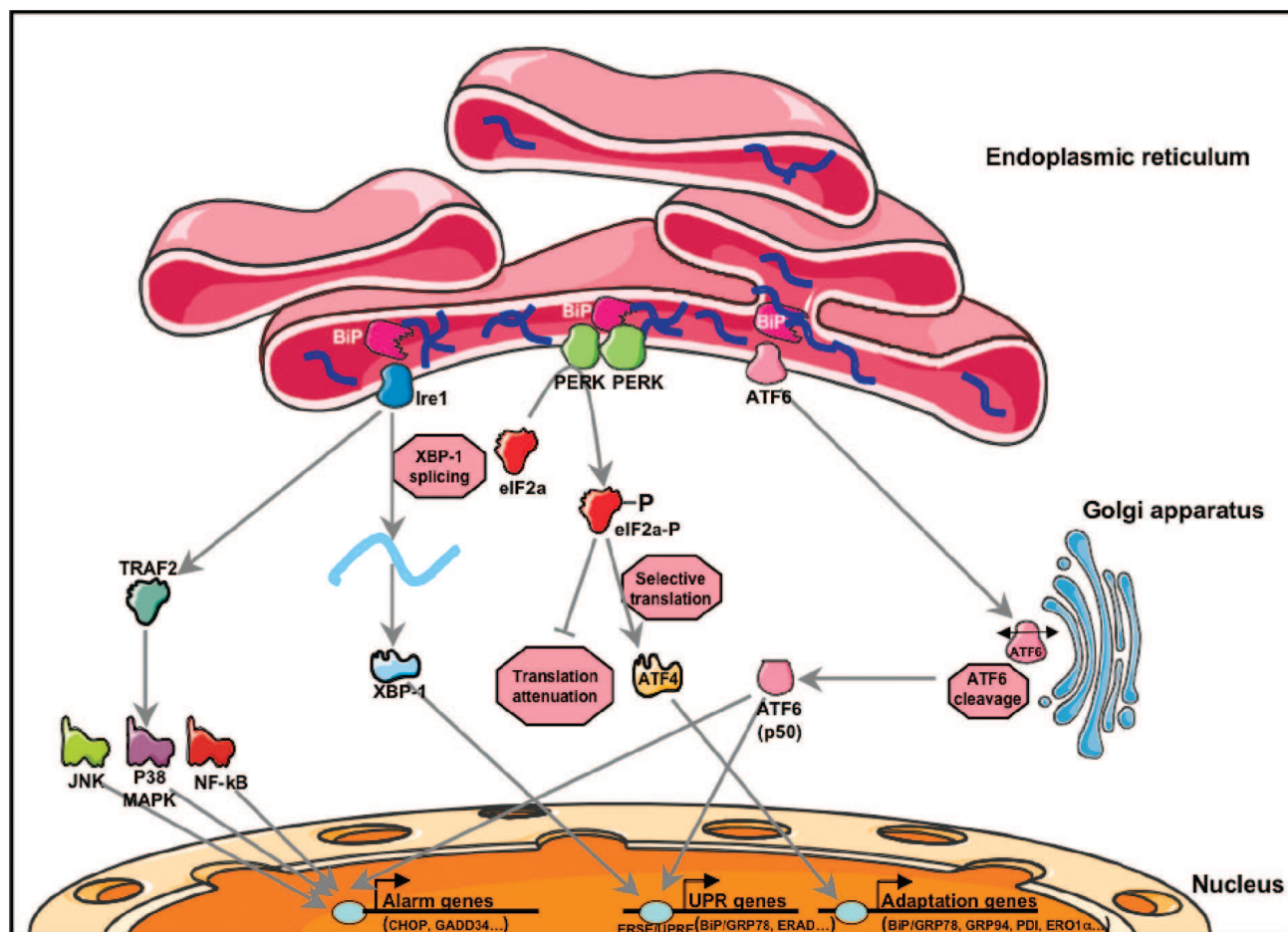


FIGURE 1. Molecular mechanisms of the unfolded protein response (UPR). Under nonstressed conditions, binding protein (BiP) binds to the luminal domain of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), and activated transcription factor 6 (ATF6) to maintain them within the endoplasmic reticulum (ER). On accumulation of unfolded proteins, BiP is recruited away from ATF6, IRE1, and PERK, thus allowing IRE1 and PERK spontaneous dimerization/oligomerization, transautophosphorylation and activation. Activated IRE1 cleaves the transcription factor XBP-1 mRNA generating a translation frameshift. XBP-1 protein translocates to the nucleus, where it binds to UPR elements. IRE1 also activates JNK, through TRAF2. eIF2α phosphorylation by phosphorylated PERK leads to the attenuation of global mRNA translation and selectively stimulates translation of a specific subset of mRNAs that contain multiple upstream open reading frames in their 5'-untranslated region, such as ATF4. ATF4 activates transcription of genes involved in amino acid metabolism and transport, oxido-reduction and ER stress induced apoptosis (CHOP). Finally, the release of BiP from ATF6 expose a Golgi localization sequence within ATF6, leading to ATF6 transport to the Golgi where it is cleaved to generate an ATF6 fragment transcription factor that translocates to the nucleus, binds to ER-stress response elements (ERSE) and induces transcription of genes such as *BiP*, *CHOP* and *XBP-1*. Alarm genes: *CHOP*, *GADD34*; UPR genes: endoplasmic reticulum chaperones and endoplasmic reticulum-associated degradation factors ([69] for details); Adaptation genes: *BiP/GRP78*, *GRP94*, *PDI*, AND *ERO1α*.

mRNA of the transcriptional factor X-box binding protein-1 (XBP-1). Spliced transcript of XBP-1 can bind to the ER stress response element (ERSE) that induces the transcription of many UPR genes encoding chaperones and folding and degradation enzymes. Under stressed condition, ATF6 leaves the ER to the Golgi apparatus where it is cleaved by proteases, thus allowing a cytosolic DNA binding unit to bind to the ERSE and induce UPR genes transcription.

The ER chaperone protein BiP is considered as a master UPR regulator and plays essential roles in activating IRE1, PERK, and ATF6 in response to stress (4). Under normal conditions, BiP binds to the luminal domains of IRE1, ATF6, and PERK to maintain them within the ER (Fig. 1). On stress conditions, BiP binds permanently to unfolded proteins and is released from IRE1, PERK, and ATF6 to permit their activa-

tion. Thus, this BiP-regulated activation provides a direct mechanism for all three UPR transducers to "sense" the stress (3).

The UPR Protects Cells Against ER Stress

For the cells, ER stress can be considered as a double-edge sword because it can trigger both prosurvival and proapoptotic signals. In ER stress conditions, the aim of the UPR is to reestablish normal ER function, by reducing messenger RNA (mRNA) translation and therefore the amount of new synthesized proteins in the ER, by increasing the proteasomal degradation of ER localized proteins, and by increasing the protein folding capacity of the ER. Induction of the PERK-eIF2 pathway results in general inhibition of translation. Activated ATF6 and XBP1 bind to ERSE and UPR elements, leading to expression of ER chaperones including

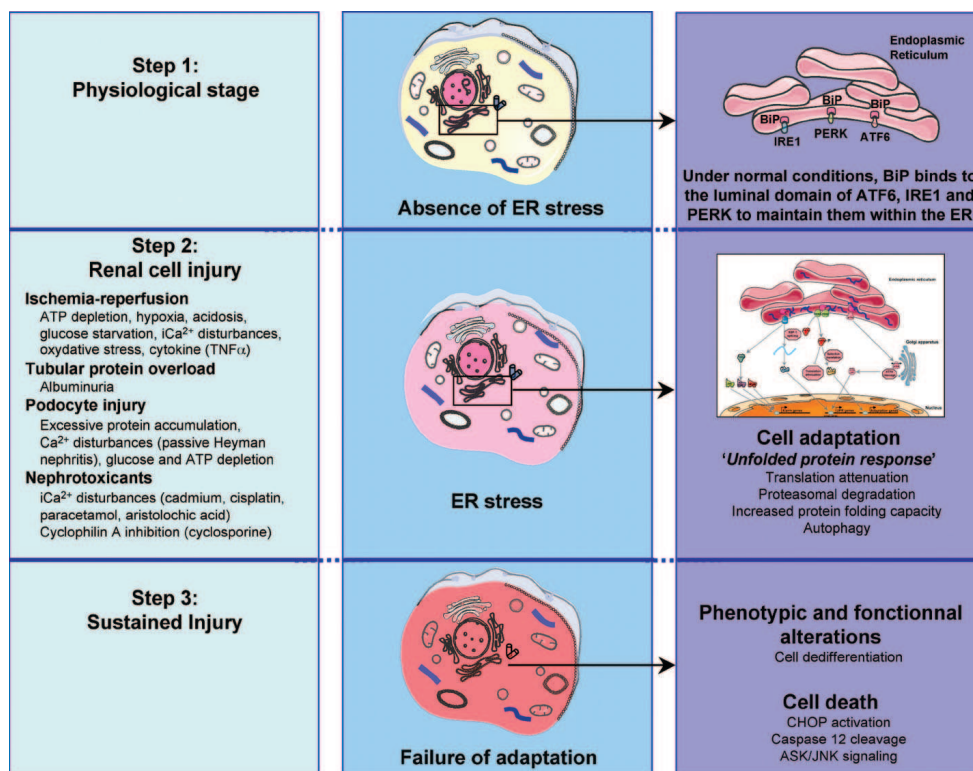


FIGURE 2. Consequences of endoplasmic reticulum stress on cellular homeostasis and survival: the example of the kidney. During unstressed conditions, binding protein (BiP) binds to the luminal domains of the three unfolded protein response (UPR) activators, ATF6, inositol-requiring enzyme-1, and PERK, and keeps them under inactivate state. When cellular injury arises that disturbs endoplasmic reticulum (ER) stress homeostasis (redox and pH status modifications, intracellular calcium stores disturbances, protein overload, glucose, and ATP depletion), misfolded proteins accumulate, leading to an ER stress. BiP preferentially binds to accumulated proteins, and then dissociates from the UPR activators, leading to the initiation of the UPR, an evolutionary conserved adaptive mechanism that help the cell to overwhelm misfolded proteins accumulation (see Fig. 1). Persistent cellular injury and ER stress lead to cell dedifferentiation and altered functional properties, such as epithelial to mesenchymal-like transition in renal epithelial cells (10). A sustained ER stress can ultimately lead to cell death.

BiP and induction of ER-associated degradation factors. These pathways contribute to survival of cells under ER stress conditions. However, when adaptation fails (i.e. stress is beyond the capacity of the compensatory machinery), cell triggers death programs, usually in the form of apoptosis (Fig. 2) (5).

The UPR Can Induce Programmed Cell Death

If the overload of unfolded or misfolded proteins in the ER is not resolved, sustained activation of the UPR leads to programmed cell death. Many apoptotic pathways are then activated (5).

IRE1 plays an important role in mediating apoptosis through c-jun N-terminal kinase (JNK) and nuclear factor κB (NF- κB) (6). IRE1 is a transmembrane kinase that share similarities with the TNF associated receptors involved in innate immunity and binds to tumor necrosis factor associated receptor 2 (TRAF2). TRAF2 activates kinases involved in inflammation such as JNK, P38 MAPK, and NF κB . JNK is known to activate the proapoptotic protein Bim and to inhibit the antiapoptotic protein BCL2 (6).

Apoptosis is also induced by the cleavage of the ER resident caspase 12. ER stress induces conformational changes and oligomerization of proapoptotic Bak and Bax at the ER membrane leading to the release of Ca^{2+} . Calpains are

activated by Ca^{2+} in the vicinity of the ER and also by IRE1 and induce caspase 12 cleavage that activates caspase 9 and the common effector caspase 3 (1).

Finally, CHOP, whose expression is regulated by XBP-1 and ATF4, is implicated in apoptosis during ER stress, by regulating proapoptotic genes such as *GADD34* (1).

Beyond Cell Life and Death

ER stress induces also a wide range of cellular responses that could have biological consequences on cellular functions. ER stress interferes with cellular differentiation in various cell types, such as chondrocytes, adipocytes, neural stem cells, myocytes, lymphocytes. For example, E-cadherin glycosylation and its cell surface transport are affected during ER stress (7). Given the critical role of E-cadherin expression in the cellular membrane to maintain an epithelial phenotype, its disruption during ER stress could contribute to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (8). Recently, ER stress has been shown to induce EMT in PC C13 thyroid cells through the activation of the transcriptional factor Snail (9). We have also shown that cyclophilin A knockdown by siRNA is associated with ER stress and epithelial phenotypic changes suggestive of EMT in human renal epithelial cells (10).

Several biological pathways are involved in cellular phenotypic changes induced by ER stress. For example, ER stress could induce phenotypic changes through the JNK signaling pathway. JNK, which is activated during ER stress after TRAF-2 recruitment and activation through IRE1 signaling (6), has been recognized as an important integrator of epithelial cell plasticity, cell migratory potential and disruption of cell-cell contact during morphogenesis. Importantly, JNK has now been implicated during renal fibrogenesis, at least in a mouse model of unilateral ureteral obstruction (11).

Challenges that May Induce ER Stress in Transplanted Organs

Transplanted organs are challenged by various insults including ischemia-reperfusion, acute rejection episodes, or calcineurin inhibitors nephrotoxicity. At the cellular level, these insults could theoretically cause biological disturbances of ER homeostasis, thus leading to the ER stress and the UPR.

Ischemia-Reperfusion Injury

Ischemia-reperfusion (I/R) is a major cause of tissue injury and leads to a variety of cellular lesions including disruption of cell polarization, disassembly of actin cytoskeleton organization, disruption of tight junctions, necrosis, and apoptosis. I/R alters graft survival by several mechanisms, including delayed graft function, enhanced immunogenicity, and healing responses. Recent evidence strongly suggests that ischemia followed by reperfusion may initiate an ER stress leading to cellular phenotypic alterations and death. ATP deficiency induced by hypoxia and glucose deprivation during ischemia initiates protein misfolding thereby inducing the UPR (12). Reperfusion of the affected organ triggers oxidative stress with subsequent alterations of redox-dependant reactions, protein disulfide bond formation, and protein folding. Moreover, oxidization of cysteins in ER-associated Ca^{2+} channels induces calcium depletion from the ER followed by alteration of the activity of the intra-ER chaperones BiP and GRP94, leading to ER stress (5, 13).

Chronic Ischemia

Transplanted organs are also subjected to chronic ischemia from various origin including loss of capillaries during the extension of a fibrosis process, chronic vasoconstriction, and arteriosclerosis. As previously mentioned, ischemia can lead to ER stress through ATP and glucose deprivation. Whether ER stress is involved in allograft structural alterations induced by chronic ischemia remains to be establish.

Calcineurin Inhibitors

Calcineurin inhibitors, cyclosporine A (CSA) and tacrolimus, are the mainstay in the prevention of solid organ rejection. However, these drugs cause perturbations of cellular functions that may induce adverse events such as nephrotoxicity and diabetes mellitus. Accumulating evidence support the role of ER stress in the pathogenesis of calcineurin inhibitors side effects (see below). Calcineurin inhibitors interfere with intracellular calcium signaling that could alter ER function, ultimately leading to ER stress. Moreover, calcineurin inhibitors inhibit the peptidyl prolyl isomerases cyclophilin A and FK-Binding protein 12, involved in the folding of nascent proteins (14, 15). By inhibiting these enzymes, CSA and ta-

crolimus might alter protein folding, thereby leading to unfolded protein accumulation in the ER lumen and ER stress. In accordance with this hypothesis, we have shown that RNA interference directed against cyclophilin A induces ER stress in tubular epithelial cells (10).

Inflammation

Increasing evidence suggest that ER stress and inflammation are closely linked. ER stress is a well-known mediator of inflammatory process, mainly through activation of NF- κ B and JNK signaling (16). The NF- κ B signaling has been shown to be induced in a cell autonomous fashion by ER stress, induced not only by the accumulation of viral proteins but also by other membrane proteins (e.g. MHC class I) (17). Moreover, it has been recently reported that systemic inflammatory responses caused by lipopolysaccharide are associated with upregulation of BiP in various organs including the lung, liver, kidney, spleen, and heart (18). Therefore, by activating the NF- κ B signaling, ER stress could induce a proinflammatory milieu, thus increasing the immunogenicity of the graft.

ER Stress in Solid Organ Transplantation: Causes and Consequences in Specific Models

Renal Ischemia-Reperfusion

I/R is known to decrease protein synthesis. Recent studies suggest that the UPR is responsible for the inhibition of protein synthesis that occurs in the postischemic reperfused rat kidney. Montie et al. (19) reported that cardiac arrest-induced ischemia and subsequent reperfusion is responsible for the phosphorylation of eIF2 α and the activation of PERK in rat kidney, leading to the inhibition of translation process and protein synthesis. This result suggests that renal I/R induces ER stress, activates UPR, and causes damage in tubular cells. The effect of ischemia on folding assembly processes in the ER plays a central role in the generation of the ischemic epithelial cell phenotype (alterations of transmembrane junctional proteins, polarized transporters, and integrins) (20). Considering that recovery from ischemic injury requires de novo synthesis, folding, and assembly of proteins, ER chaperones could play a major role in the recovery process.

As UPR can result alternatively in a prosurvival or proapoptotic outcome, ER stress plays a complex role in renal cell survival. Preconditioning of renal epithelial cells with ER stress inducers protects them against oxidative (reperfusion) injury and cytotoxicity, suggesting a protective role of the ER stress. ER stress preconditioning attenuates H_2O_2 -induced cell injury in LLC-PK1 cells by preventing an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, potentiating ERK activation, and decreasing JNK activation whereas the reduction of the key regulator of ER stress BiP with siRNA sensitizes cells (21). Conversely, I/R can also activate renal cell death through ER stress, and this response has been shown to be reduced by the anti-apoptotic protein BI-1 (Bax-inhibitor 1). BI-1 is an ER-linked protein that is upregulated during renal I/R. *Bi-1*^{-/-} mice subjected to renal I/R are sensitized to renal failure and tubular cell apoptosis. Interestingly, BI-1 controls ER stress pathways at multiple levels, because ATF6, phospho-JNK, and XBP-1 are overexpressed during I/R in *Bi-1*^{-/-} mice (22).

I/R induces in the kidney marked changes in the expression of ER specific proteins, such as the 70 kDa heat shock

protein (HSP70) and heme oxygenase-1 (HO-1). Another ER-specific protein, HSP12A, also known as ORP150, is over-expressed in tubular cells during renal I/R and has been shown to be cytoprotective during I/R injury. HSP12A over-expressing mice are less susceptible to acute renal failure during I/R injury than heterozygous mice, expressing less HSP12A, thus confirming the critical role of ER stress in renal ischemic injury. The protective role of HSP12A during ER stress seems to be linked to its chaperone properties, providing a more efficient protein transport during ER stress (23).

Liver Ischemia-Reperfusion

A major cause of primary graft nonfunction after liver transplantation remains injury due to cold I/R, and recent data suggest that ER stress is involved in the liver I/R injury. In a mice model of liver I/R, ER stress is activated, with the IRE-1 pathway being activated on early ischemia and, in a second phase, on early reperfusion. This activation may contribute to the observed reperfusion-induced activation of the mitogen-associated protein kinase (MAPK) family stress-activated protein kinase/JNK. The stress-activated protein kinase/JNK pathway is activated during the liver I/R injury and enhances liver injury during liver transplantation, mainly through the induction of hepatocyte apoptosis (24). However, whether IRE1 activates JNK signaling during I/R remains to be clearly demonstrated. The attenuation of JNK activity protects against I/R induced hepatocyte apoptosis (25). Hepatocyte apoptosis seems to be mediated by the mitochondrial permeability transition (26). Targeting JNK signaling with chemical inhibitors could be an exciting protective strategy in protecting liver transplant viability during I/R.

In contrast, the PERK pathway, leading to inhibition of cap-dependent translation, is mainly activated on reperfusion. PERK activation is detected restrictively in sinusoidal endothelial cells and could contribute to the exaggerated sensitivity of this liver cell type to I/R injury. These results correlate well with the observed defect in protein secretion and suggest that the biphasic ER stress response may influence liver secretory functions and, as a consequence, liver transplantation outcomes (27).

Apoptosis is the prominent feature of liver I/R injury and targeting ER stress-mediated apoptosis may reduce the deleterious consequences of I/R injury. Sodium 4 phenyl butyrate, a fatty acid that act as a chemical chaperone by reducing the load of mutant or misfolded protein, has been shown to protect mice against warm I/R in the liver by decreasing ER stress-mediated apoptotic signals (28).

Organ Preservation

Vascular endothelium is an important target during reperfusion after cold storage, and the preservation of its integrity is a critical factor in organ preservation for transplantation. A detailed ultrastructural analysis of human endothelial cells after 6 hr of hypothermic storage in organ preservation solutions demonstrated cell damage including disruption of intercellular contacts, organization of stress fibers, nucleus condensation, and loss of mitochondrial integrity. Interestingly, endoplasmic cisternae were distended, a feature strongly suggestive of ER stress (29).

Prevention of ischemic injury is an important factor in the success of organ transplants and it is well known that

organs display differential susceptibility to cardiac arrest. Resuscitation from cardiac arrest is another important situation in which organ sensitivity to ischemia contributes to outcome. It has been recognized that irreversible inhibition of protein synthesis in brain after I/R contributes to the death of specific neuronal populations (29). Translation arrest in reperfused brain is due to phosphorylation of eIF2 α by PERK, suggesting a role for the UPR. Experimental data in mice subjected to cardiac arrest followed by resuscitation suggest that ER stress and protein translation attenuation may play a role in differential responses of viscera to I/R. Kidney and liver display a strong and transient ER stress, whereas heart displays a more moderated response (30). Therefore, ER stress in organs may contribute to the pathophysiology of resuscitation from cardiac arrest and during organ transplantation procedures.

Replacement of conventional cold storage by continuous hypothermic perfusion may improve retrieved organ viability. In kidney transplantation, machine perfusion has shown clear benefits in human trials. Retrospective studies have suggested that machine perfusion could result in a better short-term outcome, with lower rates of delayed graft function after transplantation of kidneys from all types of deceased donors. A recent well-designed human trial compared machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation and demonstrated that hypothermic machine perfusion was associated with a reduced risk of delayed graft function and improved graft survival in the first year after transplantation (31). In animal models, the duration of perfusion seems important regarding the induction of ER stress. Rat livers perfused by a roller pump with oxygenated histidine-tryptophan-ketoglutarate solution display phosphorylation of PERK and activation of caspase 12, followed by caspase 3 cleavage, suggesting an ER-associated apoptosis. In contrast, when livers are first perfused for 2 hr and next cold stored for 16 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate, caspase 12 is no more cleaved. Moreover, this short time perfusion strategy protects liver against cytolysis and preserves hepatocyte ultrastructure alterations (32). Another study demonstrated that JNK signaling is down-regulated during hypothermic oxygenation (33). The deleterious effect of long-term perfusion on ER stress activation and apoptosis induction is independent of the type of perfusate (34). The mechanism by which long-term machine preservation activates the UPR is unknown.

Marginal and Older Allografts

Kidney allografts from extended criteria donors, also called marginal donors, or older donors suffer from various preexisting structural alterations that significantly alter graft viability and survival. Preexisting transplant vasculopathy and interstitial fibrosis secondary to advanced donor age and cold ischemia are the two main contributors of tissue injury that characterize extended criteria donors. Interestingly, such grafts are exquisitely sensitive to I/R injury, and the successful use of marginal/older donors has been associated with a significantly increased risk of delayed graft function (35). Interestingly, protein misfolding, accumulation, and aggregation characterize many aging-related diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and type II diabetes. Aging has also been shown to increase levels of abnormal proteins in

cells (36, 37), and ER chaperones have been shown to be oxidized with age (38). These data suggest that age contributes to baseline ER stress and that there is age-associated impairment in protein folding in older animals. It is therefore tempting to speculate that an increased ER stress may be involved in the sensitivity of marginal grafts to I/R injury, but objective data are lacking.

Posttransplant Diabetes Mellitus

ER stress is mechanistically implicated in the pathogenesis of diabetes mellitus, through the induction of β -cell death (39, 40). Insulin secreting cells are subjected to a high rate of protein synthesis and are exceedingly sensitive to any disturbances leading to misfolded protein accumulation. *PERK* gene mutations result in progressive loss of β cells in both mice and humans (41, 42). Mice with a homozygous mutation at the eIF2 α phosphorylation site have a β -cell deficiency (43). In rodent models of diabetes caused by a nonsecreted insulin mutant, homozygous deletion of *CHOP* delays the onset of diabetes (44).

Posttransplant diabetes mellitus affects 10 to 40% of transplanted patients and increases cardiovascular morbidity and mortality. Calcineurin inhibitors, particularly tacrolimus, are well-known risk factors for the development of posttransplant diabetes mellitus. Pathophysiology of pancreatic β -cells injury during calcineurin inhibitor treatment is not well understood, but evidence suggests that ER stress disturbance may alter cell viability. Indeed, morphologic abnormalities, including nuclear inclusions, cisternal dilatation of the rough ER vacuolization, severe cytoplasmic degranulation and degeneration of islet β cells and cell death have been described with both calcineurin inhibitors in rodent β cells (45). Mechanisms that have been proposed include impairment of glucose-stimulated insulin secretion downstream of the rise in intracellular Ca^{2+} at insulin exocytosis and reduced ATP production and glycolysis that constitute biological processes associated with ER stress (45, 46).

ER Stress, Fibrosis, and Organ Dysfunction

The importance of ER stress in the development of chronic renal tubulo-interstitial lesions has recently been highlighted by the histological analyses of mutant mice that express a mutant BiP in which the retrieval sequence of the ER is deleted. The heterozygous transgenic mice showed accelerated tubulo-interstitial lesions during aging. Furthermore, proteinuria induced by chronic protein overload accelerated the tubulo-interstitial lesions, accompanying caspase-12 activation and tubular cell apoptosis. Ohse et al. (47) reported that exposure of tubular cells to bovine serum albumin induces the ER chaperones BiP and HSP12A and caspase 12, and confirmed these results in proteinuric rats, thus suggesting that tubular cells exposed to proteinuria exhibit ER stress, which may ultimately result in tubular injury (48). These results suggest the role of ER stress in the pathophysiology of chronic renal tubulo-interstitial injury.

Cardiac allograft vasculopathy continues to limit the long-term success of cardiac transplantation and is responsible for ischemia of the cardiac allograft. Several recent studies have addressed whether ER stress is activated in the myocardium by ischemia or I/R (reviewed in [49]). Numerous ER stress response genes are induced within 24 hr of in vivo myo-

cardial infarction in mouse hearts (50), and several markers of ER stress are increased in mouse hearts subjected to ex vivo I/R, as well as in surviving cardiac myocytes bordering the infarct zone in a mouse model of in vivo myocardial infarction (51). Several studies have correlated ER stress with myocardial damage. For example, the ER stress response is activated in the hearts of transgenic mice that overexpress monocyte chemoattractant protein-1 and develop heart failure (52), suggesting that the ER stress-induced apoptosis contributes to the loss of myocardium associated with failure in this model. In a recent review, which highlighted the consequences of ER stress in the cardiovascular context, Glembotski suggested that mild or brief episodes of ischemia favor activation of prosurvival aspects of ER stress, whereas severe or long episodes lead to eventual activation of proapoptotic aspects (49). Moreover, it was suggested that the time to transition between prosurvival and proapoptotic aspects of ischemia-activated ER stress can be influenced by other factors, including the presence of additional ER stresses, or existent cardiac pathologies, both of which might decrease the time to transition. Considering that the heart allograft is likely to be injured by several ER stresses including I/R, chronic ischemia, and inflammation, these data should stimulate further studies of ER stress in the context of heart transplantation.

In liver transplantation, while in the early days after liver transplantation common causes of graft loss include I/R injury, technical complications, and recipient diseases, thereafter, the most common causes of late liver allograft dysfunction, include late-onset acute and chronic rejection, recurrent, and new-onset viral and autoimmune hepatitis, biliary strictures, and recurrent primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. A common finding is the progressive accumulation of fibrillar extracellular matrix in the liver as a consequence of reiterated liver graft tissue damage due to infective, toxic, metabolic, or autoimmune causes and the relative chronic activation of the wound healing reaction. Distinct patterns of fibrotic lesions are described depending of the primary cause of liver fibrosis. These complex patterns of fibrosis differ from the monolithic pattern of interstitial renal fibrosis, but common biological pathways leading to extracellular matrix accumulation are involved. The main profibrogenic mechanisms involved in chronic liver diseases are the chronic activation of the wound-healing reaction, the EMT, and the oxidative stress (53). Interestingly, these mechanisms, which are also implicated in renal fibrosis, involve biological process such as NF- κ B signaling, intracellular calcium disturbances, redox perturbations, proinflammatory cytokines secretion, or epithelial phenotypic changes (53). Though ER stress and the UPR have been shown to be involved in all these biological processes in various models, to our knowledge, no studies specifically focused on ER stress in chronic liver graft dysfunction.

Islet Transplantation and ER Stress

Surprisingly, few studies evaluated the implication of ER stress in islet transplantation. Isolated human pancreatic islets are susceptible to many insults that occur during donor-brain death, organ preservation, and islet isolation resulting in ischemic, mechanical, osmotic, and oxidative stress for islets. The islet grafts are further exposed to a local inflammatory and hypoxic microenvironment in the early stage post-

transplant (54). Most of these extracellular insults can result in ER stress. Considering that β cells are sensitive to ER stress (39, 40), ER stress might play an important role in β -cell death during islet isolation. In accordance with this hypothesis, Contreras et al. (55) demonstrated a cleavage of caspase 12 in isolated islets that could reflect ER stress-induced apoptosis. Interestingly, diabetic mice transplanted with the insulinoma cell line NIT-1 overexpressing the master regulator of ER stress BiP (NIT-GRP78) lived much longer than mice transplanted with NIT-1 cells, which was due apparently to prolonged insulin production by the transplanted NIT-GRP78 cells. Laybutt et al. (56) found that attenuation of ER stress by overproduction of GRP78 in a β -cell line, protected the cells significantly from lipid-induced apoptosis.

CSA Nephrotoxicity

ER stress has been described as a mediator of tubular cell death in response to various nephrotoxics including paracetamol, cisplatin, cadmium and heavy metals, aristolochic acid, and CsA (reviewed in [57]). CsA has been shown to induce ER stress. Justo et al. (58) reported that tubular cell apoptosis induced by CsA is associated with induction of CHOP. Evaluating the transcriptomic response of tubular cells to CsA, we previously suggested the implication of ER stress (59). The induction of ER stress by CsA was reinforced by the finding that CsA exposure *in vivo* results in the upregulation of the ER stress marker BiP mRNA in renal allograft biopsies (59). In a rat model of CsA nephrotoxicity, Han et al. (60) reported that a short-term treatment of CsA for 7 days activated the UPR, exemplified by the induction of BiP, and a proapoptotic response characterized by the upregulation of caspase 12 and CHOP. However, long-term treatment with CsA for 28 days decreased BiP and further increased CHOP. At this time, CsA is responsible for an extensive interstitial fibrosis, suggesting that BiP upregulation during CsA treatment serves as a protective process. The downregulation of BiP expression after a long-term treatment is then considered as a failure of cytoprotection. We recently demonstrated that ER stress can directly mediate CsA nephrotoxicity. Indeed, CsA and other ER stress inducers are responsible for epithelial phenotypic changes leading to the generation of protomyofibroblasts, independently of TGF- β signaling. RNA interference directed against cyclophilin A supported the role of its inhibition in triggering ER stress and epithelial phenotypic changes induced by CsA. Finally, Salubrinal, a selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation known to protect cells from ER stress, significantly reduced epithelial phenotypic changes and cytotoxicity induced by CsA *in vitro* and *in vivo*. These data highlight the role of ER stress during CsA nephrotoxicity in mediating cell death and also as a mediator of EMT in tubular cells (10).

Conclusion and Perspectives

In recent years, ER stress has been identified as an endogenous source of cellular stress and is now the focus of intensive investigation. If little is known regarding the effect of ER stress on transplant outcome, accumulating evidence suggest its implication in many processes associated with transplant pathophysiology (e.g., ischemia, I/R injury, organ preservation, calcineurin-inhibitor nephrotoxicity, and inflammation). As previously mentioned, ER stress can trigger

both prosurvival and proapoptotic signals. In organ transplantation, it could be considered as a potent adaptive mechanism allowing for organ to recover in the early stage posttransplantation, a characteristic that has been developed in the context of ER stress preconditioning. On the other hand, the detection of ER stress may represent a sign of sustained injury that could ultimately lead to organ dysfunction. By inducing cellular phenotypic changes such as dedifferentiation and EMT and programmed cell death in response to these pathophysiological insults, ER stress could also be considered as a relevant actor in the process leading to the progressive scarring of the allograft. To increase our understanding of the mechanisms by which ER stress can contribute to tissue recovery or injury, cell death, and organ dysfunction, extensive mechanistic studies will be required.

The study of ER stress in transplanted organs could have diagnostic and therapeutic implications. First, the early detection of ER stress markers such as BiP or CHOP in transplant biopsies could serve as a surrogate marker of early pathological process that could preclude histologic lesions (e.g., tubular necrosis, EMT, or fibrosis). For example, the ER stress marker BiP can be detected at 3 months posttransplantation in 56 protocol biopsies of stable renal allografts (Fig. 3), suggesting an early phase of ER stress. Interestingly, we found a statistically significant association between BiP expression and scores of interstitial fibrosis and tubular atrophy at 3 months posttransplantation (personal data). Thus, these results encourage further studies to delineate a prognostic role for early ER stress detection in renal allografts.

The other challenge is to evaluate the renoprotective potential of agents or interventions that can modulate ER stress. Several chemical compounds have recently emerged as potential ER stress modulators. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate that stabilizes protein conformation and improves the folding capacity of the ER has been shown to reduce *in vivo* the deleterious impact of ER stress (61). An inhibitor of advanced glycation end products, TM2002, has been shown to reduce ER stress-triggered cell death *in vitro* and to reduce I/R injury *in vivo* in the kidney (62). The JNK signaling, a critical pathway involved in ER stress-induced apoptosis, could be targeted by novel JNK inhibitors (11). We reported that the eIF2 α dephosphorylation inhibitor salubrinal that alleviates cells from the cytotoxic consequences of ER stress significantly attenuates *in vivo* CsA nephrotoxicity (10).

As ER stress activates an adaptive response to injury, modulating ER stress before transplantation could improve the grafted organ viability. In this regard, improving the ability of these grafted organs to tolerate ischemic injury would have important implications. For example, ischemic preconditioning has been shown to improve kidney (63), heart (64), and liver (65) ischemia/reperfusion-induced functional injury in various experimental models. Ischemic preconditioning consists in transient ischemic episodes induced by brief vascular occlusion followed by reperfusion. Various protective mechanisms have been suggested, including the induction of chaperones (i.e., HSP25 and HSP70) or antioxidant enzymes. Taking into account the major role of ischemia in inducing ER stress, it is tempting to speculate that ischemic preconditioning activates the UPR, particularly the adaptive and prosurvival aspects of ER stress. This hypothesis has been demonstrated in nontransplant models. For example, the in-

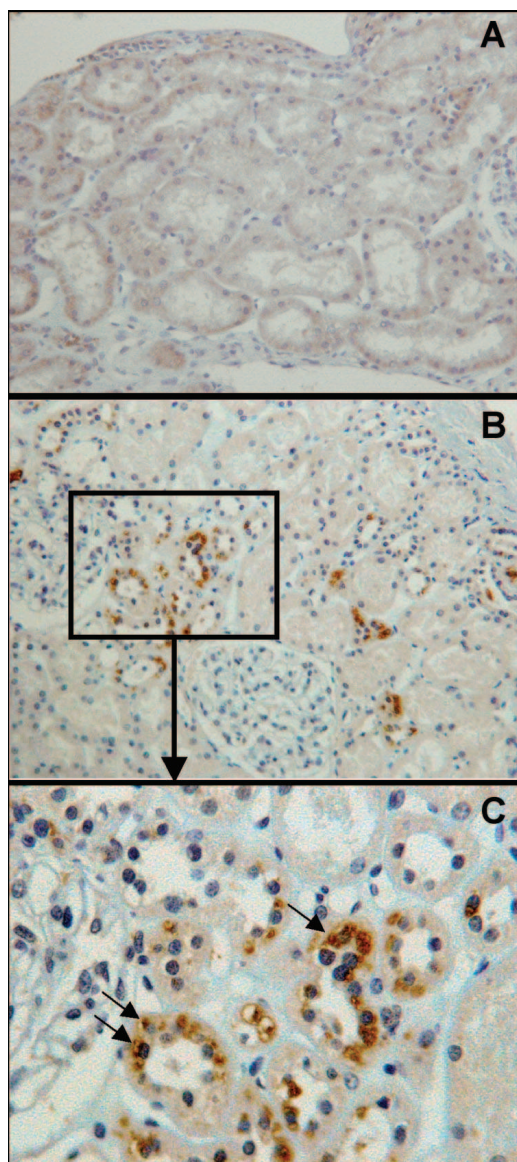


FIGURE 3. Expression of the endoplasmic reticulum stress marker binding protein (BiP) in renal allografts. BiP tubular expression was studied by immunohistochemistry using rabbit anti-human BiP polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in normal kidney (A) and protocol biopsies of renal allografts performed 3 months after transplantation. Whereas BiP was virtually absent from normal kidney (A, magnification $\times 20$), positive staining for BiP is found in tubules from biopsies performed at 3 months posttransplantation (B, magnification $\times 20$). Expression of BiP is predominantly perinuclear (arrows), suggesting an endoplasmic reticulum localization (C, magnification $\times 40$).

duction of BiP by ischemic preconditioning reduces the deleterious consequences (e.g., phosphorylation of eIF2 α and PERK) of ER stress and prevents delayed neuronal cell death in the rat (66). Specific inducers of ER stress (e.g., tunicamycin or thapsigargin) have also been used to provide an ER stress preconditioning. A recent study demonstrated that mice receiving tunicamycin or thapsigargin are protected against renal I/R injury (67). It has also been shown that after prolonged ATP depletion or oxidative stress, which were used to simulate cardiac ischemia and reperfusion injury, respec-

tively, the release of lactate dehydrogenase from tunicamycin-pretreated cardiomyocytes was significantly lower than from non-pretreated cardiomyocytes, suggesting that preinduced ER stress may protect cardiomyocytes from lethal injury (68). Moreover, as mentioned earlier, ER stress preconditioning has also been shown to protect renal epithelial cells from oxidative injury (21). These different strategies provide an exiting framework for further nephroprotective therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

The renal transplant unit from Necker Hospital is part of the Centaure network.

REFERENCES

1. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519.
2. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 181.
3. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; 279: 25935.
4. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; 101: 451.
5. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656.
6. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287: 664.
7. Zhu W, Leber B, Andrews DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 2001; 20: 5999.
8. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131.
9. Ulianich L, Garbi C, Treglia AS, et al. ER stress is associated with dedifferentiation and an epithelial-to-mesenchymal transition-like phenotype in PC Cl3 thyroid cells. *J Cell Sci* 2008; 121 (Pt 4): 477.
10. Pallet N, Bouvier N, Bendjallah A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 2008; 8: 2283.
11. Ma FY, Flanc RS, Tesch GH, et al. A pathogenic role for c-Jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 472.
12. Kaufman RJ, Scheuner SD, Schroder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 411.
13. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552.
14. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, et al. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 1989; 337: 476.
15. Harding MW, Galat A, Uehling DE, et al. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 1989; 341: 758.
16. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; 454: 455.
17. Pahl HL, Sester M, Burgert HG, et al. Activation of transcription factor NF- κ B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol* 1996; 132: 511.
18. Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, et al. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: Evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e93.
19. Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, et al. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 α kinase PERK. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 314.
20. Kuznetsov G, Bush KT, Zhang PL, et al. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8584.
21. Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, et al. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress pre-

- conditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 29317.
22. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, et al. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2809.
 23. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J* 2004; 18: 1401.
 24. Theruvath TP, Czerny C, Ramshesh VK, et al. C-Jun N-terminal kinase 2 promotes graft injury via the mitochondrial permeability transition after mouse liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1819.
 25. Boutros T, Nantel A, Emadali A, et al. The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2558.
 26. Theruvath TP, Snoddy MC, Zhong Z, et al. Mitochondrial permeability transition in liver ischemia and reperfusion: Role of c-Jun N-terminal kinase 2. *Transplantation* 2008; 85: 1500.
 27. Emadali A, Nguyen DT, Rochon C, et al. Distinct endoplasmic reticulum stress responses are triggered during human liver transplantation. *J Pathol* 2005; 207: 111.
 28. Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery* 2005; 138: 342.
 29. Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, et al. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 1999; 82: 253.
 30. Montie HL, Haezebrouck AJ, Gutwald JC, et al. PERK is activated differentially in peripheral organs following cardiac arrest and resuscitation. *Resuscitation* 2005; 66: 379.
 31. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360: 7.
 32. Minor T, Manekeller S, Sioutis M, et al. Endoplasmic and vascular surface activation during organ preservation: Refining upon the benefits of machine perfusion. *Am J Transplant* 2006; 6: 1355.
 33. Dutkowski P, Krug A, Krysiak M, et al. Detection of mitochondrial electron chain carrier redox status by transhepatic light intensity during rat liver reperfusion. *Cryobiology* 2003; 47: 125.
 34. Manekeller S, Schuppius A, Stegemann J, et al. Role of perfusion medium, oxygen and rheology for endoplasmic reticulum stress-induced cell death after hypothermic machine preservation of the liver. *Transpl Int* 2008; 21: 169.
 35. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364: 1814.
 36. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313.
 37. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239.
 38. Rabek JP, Boylston WH III, Papaconstantinou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 566.
 39. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002; 7: 335.
 40. Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 2008; 29: 317.
 41. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, et al. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 2000; 25: 406.
 42. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 2001; 7: 1153.
 43. Scheuner D, Song B, McEwen E, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001; 7: 1165.
 44. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109: 525.
 45. Penforis A, Kury-Paulin S. Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab* 2006; 32 (5 Pt 2): 539.
 46. Drachenberg C, Klassen D, Weir M. Islet damage associated with tacrolimus and cyclosporine: Morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999; 68: 396.
 47. Kimura K, Jin H, Ogawa M, et al. Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 1048.
 48. Ohse T, Inagi R, Tanaka T, et al. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; 70: 1447.
 49. Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 2007; 101: 975.
 50. Harpster MH, Bandyopadhyay S, Thomas DP, et al. Earliest changes in the left ventricular transcriptome postmyocardial infarction. *Mamm Genome* 2006; 17: 701.
 51. Thuermer DJ, Marcinko M, Gude N, et al. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2006; 99: 275.
 52. Nakanaka S, Okada T, Yoshida H, et al. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1027.
 53. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: From the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 231.
 54. Ihm SH, Matsumoto I, Zhang HJ, et al. Effect of short-term culture on functional and stress-related parameters in isolated human islets. *Transpl Int* 2009; 22: 207.
 55. Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to cell death program in isolated human pancreatic islets: Effects of gene transfer of Bcl-2. *Transpl Int* 2003; 16: 537.
 56. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 752.
 57. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress in the kidney. *Clin Exp Nephrol* 2008; 12: 317.
 58. Justo P, Lorz C, Sanz A, et al. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3072.
 59. Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, et al. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: A toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229: 184.
 60. Han SW, Li C, Ahn KO, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2008; 28: 707.
 61. Qi X, Hosoi T, Okuma Y, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 899.
 62. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, et al. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 497.
 63. Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 2001; 276: 11870.
 64. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124.
 65. Desai K, Dikdan G, Shareef A, et al. Ischemic preconditioning of the liver: A few perspectives from the bench to the bedside translation. *Liver Transpl* 2008; 14: 1569.
 66. Hayashi T, Saito A, Okuno S, et al. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 949.
 67. Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, et al. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Eur J Pharmacol* 2008; 592: 138.
 68. Zhang PL, Lun M, Teng J, et al. Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 449.
 69. Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 944.

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail a été de caractériser le rôle de deux processus d'adaptation au stress, la réponse UPR et l'autophagie, dans la réponse tubulaire rénale aux stress ischémiques et cytokiniques. Nous avons montré que l'activation de la réponse UPR, lors d'un stress carentiel, peut avoir des conséquences complexes. Elle module une réponse angiogénique et, en parallèle, génère un microenvironnement immunogène en lien avec la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Les conséquences spécifiques de l'activation de la réponse UPR en réponse à un stress carentiel sur le remodelage tissulaire restent néanmoins à déterminer dans un modèle animal d'ischémie rénale. De plus, le stress immunologique, caractérisé par l'IFN γ et rencontré dans des situations de rejets aigus ou d'infection à BK virus, active l'autophagie dans les cellules tubulaires rénales à la suite d'une déplétion en tryptophane. L'autophagie induite par l'IFN γ réduit la production de médiateurs de l'inflammation et pourrait donc avoir une fonction de limitation de l'amplitude de la réponse immune.

Ces travaux réalisés sur des modèles *in vitro* ne représentent qu'une étape initiale dans la caractérisation de ces mécanismes. En effet, le modèle cellulaire que nous avons choisi ne traduit pas le comportement réel de ces mêmes cellules dans un organe entier au sein d'un organisme. Il convient donc de valider les résultats obtenus *in vitro* en réalisant ces mêmes études, *in vivo*, chez l'animal présentant un gène déficient pour l'une des voies de la réponse UPR. Nos résultats suggèrent également l'existence d'un lien entre le stress du RE et l'inflammation rénale lors d'une ischémie froide chez le rat. Ils doivent néanmoins être interprétés dans un contexte d'ischémie aiguë « simple » car ils ne reflètent pas les conséquences du phénomène d'ischémie-reperfusion puisque nous n'avons pas analysé le stress du RE et la réponse inflammatoire après la reperfusion.

Réponse UPR et inflammation. Nous avons établi pour la première fois, un lien entre la carence en glucose, l'activation de la voie UPR et la génération d'une réponse inflammatoire par les cellules tubulaires rénales. Néanmoins, chaque voie de la réponse UPR contribue de manière différente à l'inflammation. La voie PERK ne semble pas nécessaire à l'activation de l'inflammation mais elle amplifie la réponse inflammatoire tubulaire lorsqu'elle est sélectivement induite par le salubrinal, un inhibiteur de la déphosphorylation du facteur eIF2 α . La voie IRE1 α , quant à elle, intervient en partie dans l'activation de la réponse inflammatoire et implique la voie NF- κ B. Ceci peut s'expliquer par le fait que les voies PERK et IRE1 α activent le facteur NF- κ B en réponse à un stress

du RE selon un mécanisme différent. La première entraîne une diminution de la synthèse globale des protéines et notamment de IκB, l'inhibiteur de NF-κB (Deng et al., 2004). Ce dernier est libéré et peut migrer dans le noyau afin d'activer la transcription de médiateurs de l'inflammation. La phosphorylation de IRE1α lors d'un stress du RE permet sa liaison avec TRAF2 puis le recrutement de l'IκB kinase qui phosphoryle IκB ce qui conduit à sa dégradation et à la translocation de NF-κB dans le noyau (Kaneko et al., 2003). Les données que nous avons obtenues sont à prendre en considération car PERK et IRE1 sont induits de manière différente dépendant du type cellulaire, de la nature, de l'intensité et de la durée des stimuli. La caractérisation de l'implication respective de ces voies dans l'inflammation tubulaire lors d'un stress ischémique permettrait de mieux comprendre le lien existant entre les lésions ischémiques et l'activation de l'immunité innée.

L'expression de NF-κB et des cytokines observée dans notre étude décrit un profil biphasique en réponse à un stress métabolique suggérant que le stress du RE pourrait induire l'expression de molécules pro-inflammatoires suite à l'activation transitoire de NF-κB lors de la phase précoce puis réduire cette expression au cours de la phase tardive. La protéine C/EBPβ, un facteur transcriptionnel dont l'expression est augmentée en réponse à un stress du RE, interagit avec NF-κB et l'inhibe lors d'un stress du RE (Hayakawa et al., 2010). Nous avons observé une augmentation de l'expression de C/EBPβ au cours de la carence en glucose, ce qui suggère que le stress du RE est impliqué non seulement dans l'initiation de l'inflammation rénale mais également dans son atténuation. De plus, le profil d'expression de RANTES au cours de la carence en glucose diffère de celui des autres cytokines. L'expression de RANTES est, elle aussi, biphasique mais elle persiste au-delà de 12h de stress, temps auquel l'expression des autres cytokines est déjà diminuée. La signification fonctionnelle de ces résultats sur l'accumulation des cellules T reste cependant à déterminer. L'activité chimiotactique connue de RANTES sur les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les cellules NK vers un site inflammatoire laisse supposer que RANTES peut avoir des effets délétères via le recrutement de cellules immunes, ce qui contribue à la persistance du processus inflammatoire et favorise l'alloimmunité lors de l'ischémie.

Réponse UPR et angiogenèse. L'ischémie rénale, caractérisée par une hypoxie et une carence nutritionnelle, est responsable de l'activation d'une réponse angiogénique permettant de maintenir la perfusion sanguine et de satisfaire les demandes énergétiques. Nous avons montré que la privation en glucose active une réponse angiogénique

indépendamment de la voie HIF-1 α . Ce stress carenciel entraîne la production de facteurs angiogéniques, VEGFA, bFGF et ANG par l'intermédiaire de la voie UPR. Le mode de régulation de l'expression de VEGFA via la réponse UPR diffère selon le type cellulaire. Dans notre modèle de cellules tubulaires rénales humaines, l'expression de VEGFA ne dépend que de la kinase PERK. L'activation prolongée de cette voie par le salubrinal, qui inhibe la déphosphorylation du facteur eIF2 α , augmente l'expression de VEGFA, suggérant que PERK pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle permettant d'amplifier la production de VEGFA. Le facteur bFGF est lui aussi régulé par PERK. L'inhibition de PERK réduit la sécrétion de la protéine bFGF et le salubrinal augmente sa sécrétion sans modifier l'expression de ses transcrits, suggérant que la réponse UPR induit la sécrétion de bFGF indépendamment de l'activité transcriptionnelle. bFGF pourrait donc être sécrété par une voie non conventionnelle n'impliquant pas le réseau RE-Golgi mais pouvant faire intervenir les protéines GRASPs (Golgi Reassembly Stacking Proteins) (Gee et al., 2011) ou l'autophagie par exemple. Nous avons également montré que l'expression de ANG est régulée par la réponse UPR et plus particulièrement par les protéines PERK et IRE1 α lors d'une carence en glucose. Son expression est augmentée lorsque la voie PERK/eIF2 α est inhibée et diminuée lorsque IRE1 est inhibée. En plus de son action sur la vasculogénèse rénale (Nakamura et al., 2006), l'ANG est un inhibiteur de la traduction induit en réponse à un stress. L'ANG grâce à son activité ribonucléase génère des tiRNAs (tRNA-derived stress-induced RNAs) par clivage des ARN de transfert (ARNt) (Yamasaki et al., 2009). Les tiRNA participent au déplacement des facteurs d'initiation eIF4 se fixant normalement sur les ARNm ce qui inhibe la traduction protéique et induit la formation de granules de stress cytoplasmiques (Ivanov et al., 2011). Ces résultats suggèrent qu'en plus de l'activation de PERK et de la phosphorylation de eIF2 α , la réponse UPR pourrait diminuer la traduction globale des protéines par la voie de l'ANG. Les hypothèses concernant la sécrétion non conventionnelle de bFGF et la voie alternative par laquelle la réponse UPR inhiberait la synthèse protéique en réponse à un stress pourront faire l'objet de nouvelles études afin de les valider.

GRP78 : potentiel biomarqueur. De nombreuses études ont établi une corrélation entre l'expression de la protéine chaperonne GRP78, marqueur central du stress du RE, et un grade pathologique élevé, une récurrence ou une faible survie des patients dans les cancers du sein, du foie, de la prostate, du colon, de l'estomac et du rein, conférant à ce marqueur un rôle pronostique (Lee, 2007, Kuroda et al., 2011). Dans une étude réalisée à partir de

biopsies de patients atteints d'une maladie rénale associée à *UMOD*, nous avons montré un lien entre l'accumulation d'uromoduline mutée dans les cellules tubulaires épithéliales et la surexpression de GRP78 suggérant que cette accumulation induit un stress du RE et que ce dernier est probablement impliqué dans la progression des maladies rénales associées à la mutation de *UMOD*. GRP78 pourrait donc représenter un biomarqueur potentiellement utilisable pour l'évaluation de l'agressivité d'une pathologie, pour le pronostic de récurrences dans le cas du cancer ainsi que pour la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, dans des études précliniques effectuées sur des cellules du cancer du sein positives au récepteur à l'œstrogène, la protéine GRP78 confère une résistance des cellules à l'apoptose induite par la carence en œstrogènes via la suppression de l'activité de BIK, une protéine pro-apoptotique (Fu et al., 2007). Cela laisse supposer que le niveau d'expression de GRP78 dans les cellules tumorales peut servir de marqueur pronostique de la réponse au traitement.

La réponse UPR : cible thérapeutique. Le stress du RE et les acteurs de la voie UPR ne sont pas seulement de potentiels biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques en pathologie, ils peuvent également être des cibles thérapeutiques. Plusieurs molécules sont connues pour agir sur les voies de la réponse UPR mais aucune n'est utilisée en clinique. Le salubrinal, un inhibiteur sélectif de la déphosphorylation de eIF2 α , a fait l'objet de plusieurs études expérimentales dans lesquelles son rôle protecteur vis-à-vis de la mort par inhibition de la voie apoptotique induite par le stress du RE a été mis en évidence (Boyce et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que le salubrinal protège les cellules tubulaires rénales, exposées au cadmium, de l'apoptose en inhibant la phosphorylation de deux MAP kinases, JNK et p38 (Komoike et al., 2012). D'autres méthodes exploitent la technique du préconditionnement, c'est-à-dire que les animaux ou les cellules en culture sont soumis à un stress du RE de faible intensité avant d'être exposés à un traitement induisant un stress du RE intense impliqué dans la survenue de pathologie. Le 4-phénylbutyrate (4-PBA), une chaperonne chimique, est utilisée pour réduire le stress du RE en assurant une conformation correcte des protéines. Un préconditionnement des cellules tubulaires rénales par le 4-PBA diminue l'apoptose induite par un stress du RE (Zhu et al., 2012). Dans un modèle expérimental de néphrite de Heymann chez le rat, le préconditionnement des animaux avec une dose subnéphritogénique de tunicamycine (dose qui n'induit pas de protéinurie) atténue la protéinurie observée au cours de cette pathologie (Cybulsky, 2010). De plus, les cellules mésangiales rénales soumises à un

préconditionnement par la tunicamycine ou la thapsigargine, inducteur du stress du RE par inhibition spécifique des ATPases- Ca^{2+} SERCA, acquièrent une anergie vis-à-vis de stimuli inflammatoires. Le stress modéré du RE, induit au moment du preconditionnement, active le facteur A20, un inhibiteur de NF- κ B (**Figure 9**), ce qui empêche la production de *MCP-1* lors d'une stimulation par le TNF- α ou l'IL-1 β (Hayakawa et al., 2009, Hasnain et al., 2012). De la même façon, le stress du RE peut activer un autre inhibiteur de NF- κ B, C/EBP β , via les voies PERK et IRE1, et ainsi inhiber la translocation de NF- κ B en réponse à ces mêmes stimuli inflammatoires (Hayakawa et al., 2010). Enfin, le preconditionnement ischémique réalisé par une répétition de cycles courts d'ischémie et de reperfusion permet de réduire le stress du RE au sein des reins de rats exposés à un phénomène d'ischémie-reperfusion long (Mahfoudh-Boussaid et al., 2012). Ces différents types de preconditionnement permettent de sensibiliser les cellules à de futures agressions intenses et délétères, et de réduire les dommages cellulaires et tissulaires causés par ces stress. L'étude du rôle du stress du RE et de la réponse UPR en pathologie rénale est donc nécessaire pour la découverte de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous avons montré que l'autophagie induite par l'IFN γ dans les cellules épithéliales tubulaires rénales limite la production de médiateurs pro-inflammatoires et immunostimulants. Le processus autophagique est stimulé en réponse à la phosphorylation activatrice de la kinase GCN2, elle-même activée par la déplétion en tryptophane suite à l'induction de l'indoléamine 2,3-dioxygénase par l'IFN γ .

Détection de l'autophagie. Ces travaux réalisés sur un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales rénales présentent les mêmes limites que celles énoncées précédemment pour l'étude du stress du RE. Pour mieux comprendre le lien existant entre l'IFN γ et l'autophagie, il serait donc intéressant de compléter ces études *in vitro* par l'utilisation d'un modèle *in vivo* de lésions inflammatoires rénales caractéristiques d'un rejet aigu du greffon, médiées par l'IFN γ , dans lequel l'autophagie serait déficiente. Cependant, l'étude du flux autophagique *in vivo* est difficile car les méthodes utilisées sur des cultures cellulaires ne sont pas toujours adaptables aux animaux. Les obstacles majeurs des analyses *in vivo* de ce flux sont l'identification des substrats spécifiques de l'autophagie et la capacité à inhiber la dégradation lysosomale à l'aide de la bafilomycine A₁ par exemple. En effet, pour pouvoir utiliser la protéine LC3-II comme biomarqueur du flux autophagique, il est indispensable d'inhiber la dégradation

lysosomale. Les molécules utilisées lors de cette étape peuvent être toxiques, il faut donc avoir les moyens d'évaluer cette toxicité pour interpréter les résultats. En plus de la toxicité de ces molécules chimiques, il est important de surveiller l'apport alimentaire en mesurant le poids des animaux. Une carence alimentaire peut entraîner une perte de poids considérable et est un puissant activateur de l'autophagie. Une autre limite majeure de l'analyse de l'autophagie *in vivo* est la variabilité entre les animaux. Ces derniers ne vont pas toujours activer l'autophagie en même temps, ce qui oblige les manipulateurs à répéter les expérimentations plusieurs fois et à inclure plusieurs animaux dans chaque expérimentation. Bien que les techniques d'analyse de l'autophagie *in vivo* ne soient pas aussi bien établies que pour les cellules en culture, il est quand même possible de suivre son flux en étudiant l'expression de la protéine LC3 couplée à la protéine fluorescente verte (GFP) par microscopie électronique ou d'évaluer l'expression de p62 par western blot ou par immunohistochimie (Klionsky, 2012). Dans les tissus humains, le processus autophagique est peu étudié car la microscopie électronique à transmission, méthode standard utilisée pour identifier l'accumulation d'autophagosomes, est un procédé laborieux et les images obtenues sont parfois difficiles à interpréter. Toutefois, des techniques immunohistochimiques permettant de détecter la forme LC3-II dans des échantillons de tissus tumoraux humains de xénogreffes se développent et pourront améliorer l'évaluation de l'autophagie dans les études de développement de molécules anticancéreuses ciblant le processus autophagique (Holt et al., 2011, Ladoire et al., 2012).

Mécanismes d'activation de l'autophagie par l'IFN γ . Nous avons mis en évidence l'implication de la voie GCN2 dans le contrôle de l'autophagie dans les cellules tubulaires rénales. Il est néanmoins possible que d'autres mécanismes soient mis en jeu dans cette régulation. Chez la souris, la protéine Irgm1 (Immunity-related GTPase family M member 1) est essentielle à l'activation de l'autophagie induite par l'IFN γ (Singh et al., 2006). Cependant, IRGM, l'orthologue humain de Irgm1, n'est pas induite par l'IFN γ suggérant que d'autres acteurs sont impliqués dans l'activation de l'autophagie par l'IFN γ . Une étude récente montre que l'IFN γ induit l'autophagie indépendamment de Irgm1 mais impliquerait la voie JAK1/2 et la voie p38-MAPK sans faire intervenir STAT1, habituellement phosphorylée par JAK1 et JAK2 (Matsuzawa et al., 2012). La voie eIF2 α est également impliquée dans la régulation de l'autophagie. Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α est inhibé secondairement à la phosphorylation de la Sérine 51 par les protéines kinases eIF2 α que sont GCN2, PERK, PKR et HRI, ce qui induit la transcription

sélective des gènes *LC3* et *Atg5* (Rouschop et al., 2010). GCN2 peut être activée, comme nous l'avons montré, par l'IFN γ , la kinase PERK est activée lors d'un stress du RE pouvant être induit par l'IFN γ (Lin et al., 2007) et PKR par l'IFN γ lors d'une infection virale. Ces situations de stress peuvent survenir au sein du greffon rénal et les kinases PERK et PKR, en plus de GCN2, pourraient initier l'autophagie dans les cellules lésées de l'organe transplanté (Talloczy et al., 2002). Dans notre travail, la voie MTOR ne semble pas impliquée dans la régulation de l'autophagie induite par l'IFN γ , suggérant que la déplétion en tryptophane n'interfère pas avec MTOR et que GCN2 et MTOR ont une sensibilité et une spécificité différentes vis-à-vis des acides aminés présents dans l'environnement. Lors de la transplantation, le rein est soumis à d'autres agressions pouvant inhiber MTOR et donc contribuer à l'activation de l'autophagie.

Autophagie et immunité. Les effecteurs de la réponse immune sont des agresseurs du parenchyme rénal et participent au développement de la NCT, notamment en contribuant au processus de fibrose. Au cours d'un rejet aigu, les cellules de l'immunité vont sécréter des cytokines comme l'IFN γ qui va agir sur l'épithélium rénal, notamment en activant l'autophagie. L'autophagie induite par l'IFN γ dans les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales régule la réponse immune de deux manières opposées. La première serait en faveur de l'activation de la réponse immune adaptative. En effet, l'IFN γ entraîne une colocalisation de la protéine LC3 et de la molécule HLA-DM, suggérant que les autophagosomes peuvent fusionner avec les compartiments chargés en molécules du CMH de classe II et, par extension, participer à la présentation de l'antigène dans les cellules épithéliales. Le second effet limiterait l'induction de l'immunité innée et adaptative. En effet, l'autophagie induite par l'IFN γ réduit la sécrétion de facteurs inflammatoires et immunostimulants car une inhibition de *Beclin-1* par ARN interférence favorise la production de ces médiateurs. Nos résultats suggèrent donc que l'autophagie induite par l'IFN γ joue un rôle anti-inflammatoire. Dans le cadre de la transplantation rénale, l'activation de la réponse immune est délétère pour le greffon. La contribution de l'autophagie dans chacune de ces réponses, à savoir la présentation antigénique et la réponse inflammatoire, reste encore à déterminer dans les cellules épithéliales rénales afin de connaître le réel impact de l'autophagie sur la survie du greffon.

Autophagie et inflammation : p62 et NF- κ B. L'autophagie pourrait inhiber la réaction inflammatoire en dégradant p62, une protéine ciblée par l'autophagie dans des conditions de stress (White, 2012). Lorsque le processus autophagique est inhibé, p62 s'accumule

dans le cytoplasme et entraîne l'accumulation de mitochondries endommagées, l'activation d'un stress oxydant ainsi que l'induction de réponses secondaires aux dommages à l'ADN. p62 peut également activer le facteur de transcription NF- κ B en interagissant avec TRAF6 dans des cellules tumorales (Mathew et al., 2009). Si l'autophagie est défectueuse, p62 ne sera plus dégradée et pourra induire NF- κ B puis la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation. L'autophagie permet donc d'éviter l'accumulation de p62 et d'inhiber l'activation inappropriée de NF- κ B et par conséquent, de réduire la sécrétion de cytokines inflammatoires. Ces travaux, effectués sur une lignée immortalisée, corroborent nos résultats qui montrent qu'une altération de l'autophagie entraîne, en réponse à l'IFN γ , une sécrétion de cytokines plus élevée que lorsque l'autophagie n'est pas inhibée. Cela suggère que la dégradation de p62 par l'autophagie, elle-même induite par l'IFN γ , peut bloquer la voie NF- κ B et réduire la sécrétion de cytokines. A l'inverse, quand Beclin-1 est inhibée, NF- κ B peut être activé et la sécrétion de cytokines augmentée.

Autophagie et inflammation : inflammasome. L'autophagie pourrait également limiter la réaction inflammatoire en inhibant l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multiprotéique constitué d'un ou plusieurs récepteurs Nod-like (NLRs) qui sont activés par un stress ou suite à une infection cellulaire. Les NLRs entraîne l'activation de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 initiant ainsi l'immunité innée. L'activation des inflammasomes AIM2 et NLRP3 par un stress inflammatoire induit l'autophagie dans une lignée de monocytes humains. Il a été montré que l'inhibition de l'autophagie augmente la production d'IL-1 β et que l'inflammasome peut recruter p62 qui est reconnue par les autophagosomes, suggérant que l'induction simultanée du processus autophagique et de l'inflammasome permet de limiter l'activité de l'inflammasome par séquestration de celui-ci par les autophagosomes (Shi et al., 2012). Nos résultats montrent que l'IFN γ induit l'autophagie et la protéine PKR peut être activée par l'IFN γ (Sharma et al., 2011). PKR, en interagissant avec les composants de l'inflammasome, intervient dans l'activation de la caspase-1 et le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β et représente un médiateur de la stimulation de l'inflammasome (Lu et al., 2012). L'IFN γ pourrait donc, à la fois, activer l'autophagie et l'inflammasome. Nos résultats mettant en évidence une augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires lorsque *Beclin-1* est inhibée par ARN interférence semblent concordés avec ceux des études précédentes. L'inflammasome, pouvant être formé en situation de stress dans les cellules épithéliales tubulaires rénales (Shigeoka et al., 2010), pourrait donc être éliminé par l'autophagie induite par l'IFN γ , ce

qui bloquerait la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18 et inhiberait l'initiation de la réponse immune innée.

Autophagie et inflammation : sécrétion non conventionnelle de cytokines. Des études récentes indiquent que l'autophagie n'aurait pas seulement un rôle anti-inflammatoire mais pourrait également être une voie de sécrétion non conventionnelle de molécules, telles que des cytokines, et les redirigerait dans le milieu extracellulaire (Duran et al., 2010, Manjithaya et al., 2010, Michaud et al., 2011, Dupont et al., 2011). L'activation de l'autophagie peut, par exemple, augmenter la sécrétion de l'IL-1 β dans les macrophages murins grâce à la coopération de GRASP55 et Rab8a, une GTPase contrôlant l'exocytose (Dupont et al., 2011). Elle peut également participer à la sécrétion de Abc1, homologue de AbcA chez la levure et protéine très conservée au cours de l'évolution. Les étapes tardives de l'autophagie comme la fusion des autophagosomes avec les endosomes ou les lysosomes ne semblent pas intervenir dans la sécrétion de Abc1 (Duran et al., 2010, Manjithaya et al., 2010). L'autophagie est également responsable de la libération immunogène d'ATP des cellules mourantes dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne l'activation des récepteurs purinergiques P2RX7 et favorise la production d'IL-1 β par les cellules dendritiques (Michaud et al., 2011). Nos résultats indiquent, au contraire, que l'autophagie régule négativement la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse à l'IFN γ ce qui corrobore les études précédentes démontrant que l'autophagie diminue la production d'IL-1 β par un mécanisme pouvant impliquer la destruction de l'inflammasome ou l'élimination des mitochondries altérées (Nakahira et al., 2011, Shi et al., 2012). En effet, la déplétion des protéines autophagiques, notamment de LC3B et Beclin-1, active la caspase-1 et favorise l'accumulation de mitochondries altérées en réponse au LPS (Lipopolysaccharide) et à l'ATP, ce qui conduit à la libération d'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cytosol. L'ADNmt contribue à la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. Ceci suggère que les protéines autophagiques régulent l'inflammasome en préservant l'intégrité mitochondriale (Nakahira et al., 2011).

Autophagie, réponse immune, déplétion en tryptophane et kynurénines. Enfin, nos résultats mettent en évidence le rôle de la déplétion en tryptophane dans la régulation des fonctions immunes. L'induction de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase, IDO, par l'IFN γ active le métabolisme du tryptophane et la production de ses métabolites, les kynurénines. La déplétion en tryptophane est tolérogénique car elle inhibe la prolifération des lymphocytes T helper et favorise l'amplification des lymphocytes T régulateurs

(LTreg). Elle peut activer GCN2 dans les lymphocytes T entraînant ainsi l'arrêt de la prolifération, l'anergie et la production des LTreg (Munn et al., 2005, Fallarino et al., 2006). L'autophagie induite par la déplétion en tryptophane pourrait participer à la régulation des fonctions immunes car les protéines autophagiques sont impliquées dans l'inactivation de la réponse immune (Saitoh and Akira, 2010). La L-kynurénine, principal métabolite du tryptophane, joue également un rôle dans l'immunité innée et adaptative. La L-kynurénine, et plus généralement les kynurénines, ont des effets cytotoxiques et sont des inhibiteurs de la prolifération cellulaire et de l'expansion clonale des lymphocytes T. Elles favorisent la mort par apoptose des cellules T, notamment par l'intermédiaire de la voie des ERO (Song et al., 2011). Aucune donnée n'existe quant à l'implication de l'autophagie dans la régulation de la réponse immune par la L-kynurénine. Des résultats préliminaires semblent montrer que la L-kynurénine inhiberait l'autophagie. Un approfondissement de l'étude des mécanismes conduisant à l'inhibition de l'autophagie et des conséquences de cette inhibition par la L-kynurénine est donc essentiel pour une meilleure compréhension de la régulation des réponses immunes innée et adaptative.

En conclusion, ce travail met en lumière le rôle du stress du RE en pathologie rénale et renforce l'idée d'utiliser les acteurs du stress du RE comme biomarqueurs pronostiques et diagnostiques de souffrance tissulaire et comme cibles thérapeutiques.

L'étude du rôle de l'autophagie en pathologie cancéreuse, rénale ou neurodégénérative, est en pleine expansion. Bien que certaines études présentent l'autophagie comme un processus contribuant à la génération d'une réponse inflammatoire, la majorité des travaux, dont le nôtre fait partie, mettent en évidence un rôle anti-inflammatoire de l'autophagie. En transplantation rénale, la réaction inflammatoire est délétère pour l'épithélium et l'endothélium du greffon puisqu'elle participe au processus de fibrose, et à long terme, à la dysfonction du transplant. L'activation de l'autophagie pourrait donc être une perspective intéressante dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à limiter l'inflammation et donc à réduire les lésions du parenchyme rénal. Les méthodes immunohistochimiques détectant LC3-II se développent dans le domaine du cancer. Elles pourraient également être réalisées sur des biopsies de greffons rénaux et permettraient le suivi thérapeutique ciblant les épisodes inflammatoires survenant dans le greffon rénal.

L'amplitude de la fonction de l'autophagie reste cependant à déterminer plus précisément dans la pathologie du greffon rénal. En effet, le rôle de l'autophagie est

complexe car les modèles expérimentaux montrent que, à la fois, l'induction et l'inhibition de l'autophagie peuvent avoir des conséquences protectrices selon les modèles étudiés. Ces différents travaux nous ont enseigné que la modification du flux autophagique, les facteurs initiateurs et le fait que ces modifications de flux soient primaires ou compensatoires est à considérer avant que l'autophagie ne puisse être une cible thérapeutique dans les maladies rénales.

Références bibliographiques

- Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK and Vander Jagt DL. (2002). Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2791-8.
- Abend JR, Low JA and Imperiale MJ. (2007). Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J Virol* 81, 272-9.
- Afrouzian M, Ramassar V, Urmson J, Zhu LF and Halloran PF. (2002). Transcription factor IRF-1 in kidney transplants mediates resistance to graft necrosis during rejection. *J Am Soc Nephrol* 13, 1199-209.
- Akcaay A, Nguyen Q and Edelstein CL. (2009). Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009, 137072.
- Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, Tohyama M, Ogawa S and Matsuda H. (2005). 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 517-25.
- Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A and Ogawa S. (2004). ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J* 18, 1401-3.
- Beimler J, Sommerer C and Zeier M. (2007). The influence of immunosuppression on the development of BK virus nephropathy-- does it matter? *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 8, viii66-viii71.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J and Mazure NM. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29, 2570-81.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G and Rifkin DB. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45.
- Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, Koumenis C, Harding HP, Ron D, Holcik M and Bell JC. (2006). Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol Cell Biol* 26, 9517-32.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H and Meijer AJ. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243, 240-6.
- Bonventre JV and Yang L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 121, 4210-21.
- Boor P, van Roeyen CR, Kunter U, Villa L, Bucher E, Hohenstein B, Hugo CP, Eriksson U, Satchell SC, Mathieson PW, Eitner F, Floege J and Ostendorf T. (2010). PDGF-C mediates glomerular capillary repair. *Am J Pathol* 177, 58-69.
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D and Yuan J. (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-9.
- Broekema M, Harmsen MC, van Luyn MJ, Koerts JA, Petersen AH, van Kooten TG, van Goor H, Navis G and Popa ER. (2007). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats. *J Am Soc Nephrol* 18, 165-75.
- Burman C and Ktistakis NT. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett* 584, 1302-12.
- Carmeliet P and Jain RK. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.
- Chapman JR, O'Connell PJ and Nankivell BJ. (2005). Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 16, 3015-26.

- Chatterjee PK, Patel NS, Sivarajah A, Kvale EO, Dugo L, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Yaqoob MM and Thiernemann C. (2003). GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 63, 853-65.
- Choi YJ, Chakraborty S, Nguyen V, Nguyen C, Kim BK, Shim SI, Suki WN and Truong LD. (2000). Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31, 1491-7.
- Coe H and Michalak M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus, F96-F103.
- Colvin RB. (2003). Chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349, 2288-90.
- Cross MJ and Claesson-Welsh L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22, 201-7.
- Cullinan SB and Diehl JA. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279, 20108-17.
- Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Khadir A, Liu J and Peng H. (2002). Complement C5b-9 membrane attack complex increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in glomerular epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 41342-51.
- Cybulsky AV. (2010). Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int* 77, 187-93.
- Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, Harding HP and Ron D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24, 10161-8.
- Denton D, Shravage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH and Kumar S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 19, 1741-6.
- Deretic V and Levine B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5, 527-49.
- Deretic V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 240, 92-104.
- Dhanasekaran DN and Reddy EP. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-51.
- Dickhout JG and Krepinsky JC. (2009). Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxid Redox Signal* 11, 2341-52.
- Djamali A, Reese S, Yracheta J, Oberley T, Hullett D and Becker B. (2005). Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant* 5, 500-9.
- Djamali A. (2007). Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F445-55.
- Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA and Griffin MD. (2007). Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 71, 619-28.
- Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ and Samali A. (2011). Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med* 15, 2025-39.
- Dreux M and Chisari FV. (2011). Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* 3, 1342-57.

- Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouche-careilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A and Moenner M. (2007). IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 67, 6700-7.
- Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D and Deretic V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J* 30, 4701-11.
- Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF and Malhotra V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* 188, 527-36.
- Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y and Watada H. (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 8, 325-32.
- Eizirik DL, Cardozo AK and Cnop M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29, 42-61.
- El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM and Cosio FG. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 9, 527-35.
- Ellgaard L and Helenius A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-91.
- Essakalli M, Atouf O, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S and Brick C. (2009). [Toll-like receptors]. *Pathol Biol (Paris)* 57, 430-8.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC and Puccetti P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176, 6752-61.
- Fine LG and Norman JT. (2008). Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 74, 867-72.
- Fu Y, Li J and Lee AS. (2007). GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 67, 3734-40.
- Fujii Y, Khoshnoodi J, Takenaka H, Hosoyamada M, Nakajo A, Bessho F, Kudo A, Takahashi S, Arimura Y, Yamada A, Nagasawa T, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Lee AS and Yan K. (2006). The effect of dexamethasone on defective nephrin transport caused by ER stress: a potential mechanism for the therapeutic action of glucocorticoids in the acquired glomerular diseases. *Kidney Int* 69, 1350-9.
- Gago M, Cornell LD, Kremers WK, Stegall MD and Cosio FG. (2012). Kidney allograft inflammation and fibrosis, causes and consequences. *Am J Transplant* 12, 1199-207.
- Gan B, Peng X, Nagy T, Alcaraz A, Gu H and Guan JL. (2006). Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNFalpha and TSC-mTOR signaling pathways. *J Cell Biol* 175, 121-33.
- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C and Esteban M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-60.
- Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH and Lee MG. (2011). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146, 746-60.

- George PM, Badiger R, Alazawi W, Foster GR and Mitchell JA. (2012). Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther* 135, 44-53.
- Goes N, Sims T, Urmson J, Vincent D, Ramassar V and Halloran PF. (1995). Disturbed MHC regulation in the IFN-gamma knockout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for IFN-gamma. *J Immunol* 155, 4559-66.
- Guerrot D, Dussaule JC, Kavvadas P, Boffa JJ, Chadjiachristos C and Chatziantoniou C. (2012). Progression of renal fibrosis: the underestimated role of endothelial alterations. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S15.
- Gunaratnam L and Bonventre JV. (2009). HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol* 20, 1877-87.
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI and Deretic V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-66.
- Haas C, Ryffel B, Aguet M and Le Hir M. (1995). MHC antigens in interferon gamma (IFN gamma) receptor deficient mice: IFN gamma-dependent up-regulation of MHC class II in renal tubules. *Kidney Int* 48, 1721-7.
- Halloran PF, Afrouzian M, Ramassar V, Urmson J, Zhu LF, Helms LM, Solez K and Kneteman NM. (2001a). Interferon-gamma acts directly on rejecting renal allografts to prevent graft necrosis. *Am J Pathol* 158, 215-26.
- Halloran PF, Miller LW, Urmson J, Ramassar V, Zhu LF, Kneteman NM, Solez K and Afrouzian M. (2001b). IFN-gamma alters the pathology of graft rejection: protection from early necrosis. *J Immunol* 166, 7072-81.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H and Mizushima N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-9.
- Harari OA and Liao JK. (2010). NF-kappaB and innate immunity in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 1207, 32-40.
- Hardie DG. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117, 5479-87.
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM and Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-33.
- Harris J. (2011). Autophagy and cytokines. *Cytokine* 56, 140-4.
- Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschopp J, Kornfeld H, Fitzgerald KA and Lavelle EC. (2011). Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem* 286, 9587-97.
- Hartleben B, Godel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Kobler S, Wiech T, Grahmmer F, Arnold SJ, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Pavenstadt H, Kerjaschki D, Mizushima N, Shaw AS, Walz G and Huber TB. (2010). Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest* 120, 1084-96.
- Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC and McGuckin MA. (2012). The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol* 90, 260-70.
- Hatahet F and Ruddock LW. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 11, 2807-50.

- Hayakawa K, Hiramatsu N, Okamura M, Yamazaki H, Nakajima S, Yao J, Paton AW, Paton JC and Kitamura M. (2009). Acquisition of anergy to proinflammatory cytokines in nonimmune cells through endoplasmic reticulum stress response: a mechanism for subsidence of inflammation. *J Immunol* 182, 1182-91.
- Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, Okamura M, Huang T, Saito Y, Tagawa Y, Tamai M, Takahashi S, Yao J and Kitamura M. (2010). ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol* 21, 73-81.
- Holt SV, Wyspianska B, Randall KJ, James D, Foster JR and Wilkinson RW. (2011). The development of an immunohistochemical method to detect the autophagy-associated protein LC3-II in human tumor xenografts. *Toxicol Pathol* 39, 516-23.
- Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A and Nagata K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-22.
- Huang S and Houghton PJ. (2001). Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat* 4, 378-91.
- Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, Inoki K, Jiang M, Koya D, Kume S, Lieberthal W, Pallet N, Quiroga A, Ravichandran K, Susztak K, Yoshida S and Dong Z. (2012). Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging. *Autophagy* 8.
- Ichimura Y and Komatsu M. (2010). Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* 32, 431-6.
- Ichimura Y and Komatsu M. (2011). Pathophysiological role of autophagy: lesson from autophagy-deficient mouse models. *Exp Anim* 60, 329-45.
- Inagi R. (2009). Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 112, e1-9.
- Isaka Y, Kimura T and Takabatake Y. (2011). The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy* 7, 1085-7.
- Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP and Anderson P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell* 43, 613-23.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H and Neilson EG. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341-50.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A and Hall MN. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6, 1122-8.
- Jahreiss L, Menzies FM and Rubinsztein DC. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 9, 574-87.
- Jiang M, Liu K, Luo J and Dong Z. (2010). Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 176, 1181-92.
- Joubert PE, Pombo Gregoire I, Meiffren G, Rabourdin-Combe C and Faure M. (2011). [Autophagy and pathogens: <<Bon appetit Messieurs!>>]. *Med Sci (Paris)* 27, 41-7.
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, Nguyen YH, Kang TM, Yoon KH, Kim JW, Jeong YT, Han MS, Lee MK, Kim KW, Shin J and Lee MS. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 8, 318-24.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D and Hardie DG. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.

- Kaneko M, Niinuma Y and Nomura Y. (2003). Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* 26, 931-5.
- Karamysheva AF. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73, 751-62.
- Kaushal GP, Basnakian AG and Shah SV. (2004). Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66, 500-6.
- Kawai T and Akira S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-9.
- Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T and Nangaku M. (2009). Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 24, 2665-72.
- Kim I, Xu W and Reed JC. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7, 1013-30.
- Kim J, Kundu M, Viollet B and Guan KL. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132-41.
- Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH and Saito Y. (2008a). Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1023-9.
- Kimura S, Noda T and Yoshimori T. (2008b). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33, 109-22.
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T, Rakugi H and Isaka Y. (2011). Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 22, 902-13.
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I and Johansen T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 33, 505-16.
- Kitano H, Nishimura H, Tachibana H, Yoshikawa H and Matsuyama T. (2004). ORP150 ameliorates ischemia/reperfusion injury from middle cerebral artery occlusion in mouse brain. *Brain Res* 1015, 122-8.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M and Ohsumi Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539-45.
- Klionsky DJ, et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K and Chiba T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 425-34.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E and Tanaka K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-4.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y,

- Kominami E and Tanaka K. (2007a). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-63.
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Jr., Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K and Yue Z. (2007b). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14489-94.
- Komoike Y, Inamura H and Matsuoka M. (2012). Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 86, 37-44.
- Kosieradzki M and Rowinski W. (2008). Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 40, 3279-88.
- Kowanetz M and Ferrara N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 12, 5018-22.
- Kriz W, Kaissling B and Le Hir M. (2011). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 121, 468-74.
- Kroemer G, Marino G and Levine B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40, 280-93.
- Kruger U, Wang Y, Kumar S and Mandelkow EM. (2011). Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol Aging*.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T and Mizushima N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-6.
- Kuma A and Mizushima N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 21, 683-90.
- Kuroda K, Horiguchi A, Asano T, Ito K, Asakuma J, Sato A, Yoshii H, Hayakawa M, Sumitomo M and Asano T. (2011). Glucose-regulated protein 78 positivity as a predictor of poor survival in patients with renal cell carcinoma. *Urol Int* 87, 450-6.
- Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD and Nankivell BJ. (1999). Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation* 67, 1222-30.
- Ladoire S, Chaba K, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Michaud M, Poirier-Colame V, Andreiuolo F, Galluzzi L, White E, Rosenfeldt M, Ryan KM, Zitvogel L and Kroemer G. (2012). Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy* 8.
- Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS and Glimcher LH. (2011). Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8885-90.
- Lee AS. (2007). GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67, 3496-9.
- Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, Lee ST, Kim M, Ryu H and Jung YK. (2012). IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum Mol Genet* 21, 101-14.
- Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N and Iwasaki A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398-401.
- Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, Akira S, van der Poll T, Weening JJ and Florquin S. (2005). Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 115, 2894-903.

- Leonard EC, Friedrich JL and Basile DP. (2008). VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1648-57.
- Levine B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446, 745-7.
- Levine B and Deretic V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-77.
- Levine B and Kroemer G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Levine B, Mizushima N and Virgin HW. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323-35.
- Li W, Yang Q and Mao Z. (2011a). Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* 68, 749-63.
- Li WW, Li J and Bao JK. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 69, 1125-36.
- Li X, Zhang K and Li Z. (2011b). Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol* 4, 8.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H and Levine B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-6.
- Lin W, Bailey SL, Ho H, Harding HP, Ron D, Miller SD and Popko B. (2007). The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *J Clin Invest* 117, 448-56.
- Lindholm D, Wootz H and Korhonen L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13, 385-92.
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ and Yap GS. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med* 203, 2063-71.
- Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G and Lee AS. (1994). The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4, 1-18.
- Liu J and Lin A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15, 36-42.
- Lorz C, Justo P, Sanz A, Subira D, Egido J and Ortiz A. (2004). Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol* 15, 380-9.
- Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P, Valdes-Ferrer SI, Olofsson PS, Kalb T, Roth J, Zou Y, Erlandsson-Harris H, Yang H, Ting JP, Wang H, Andersson U, Antoine DJ, Chavan SS, Hotamisligil GS and Tracey KJ. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*.
- Luo S, Mao C, Lee B and Lee AS. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26, 5688-97.
- Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M and Klionsky DJ. (2012). The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009357.
- Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hadj-Ayed K, Miled AH, Saidane-Mosbahi D, Rosello-Catafau J and Ben Abdennebi H. (2012). Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1alpha in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *J Biomed Sci* 19, 7.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O and Kroemer G. (2007a).

- Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26, 2527-39.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A and Kroemer G. (2007b). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-52.
- Majmudar AJ, Wong WJ and Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 40, 294-309.
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O and Sonenberg N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416-22.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S and Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6, 458-71.
- Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF and Subramani S. (2010). Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol* 188, 537-46.
- Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR and Nangaku M. (2004). Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int* 65, 871-80.
- Marjon PL, Bobrovnikova-Marjon EV and Abcouwer SF. (2004). Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol Cancer* 3, 4.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S and Sandri M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10, 507-15.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V and White E. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-75.
- Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, Akira S, Noda T and Yoshimori T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11, 385-96.
- Matsuzawa T, Kim BH, Shenoy AR, Kamitani S, Miyake M and Macmicking JD. (2012). IFN-gamma Elicits Macrophage Autophagy via the p38 MAPK Signaling Pathway. *J Immunol*.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-5.
- Mayer C and Grummt I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25, 6384-91.
- Mayer G. (2011). Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 26, 1132-7.
- Meijer AJ and Codogno P. (2009). Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46, 210-40.
- Mengel M, Chang J, Kayser D, Gwinner W, Schwarz A, Einecke G, Broecker V, Famulski K, de Freitas DG, Guembes-Hidalgo L, Sis B, Haller H and Halloran PF. (2011). The molecular phenotype of 6-week protocol biopsies from human renal allografts: reflections of prior injury but not future course. *Am J Transplant* 11, 708-18.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, di Virgilio F, Zitvogel L and Kroemer G. (2011). Autophagy-

- dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573-7.
- Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, Mizushima NN, Iwasaki A, He YW, Swat W and Virgin HWt. (2008). The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* 4, 309-14.
- Mimura I and Nangaku M. (2010). The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 6, 667-78.
- Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L, Hu Y, Fabre C, Minami J, Ohguchi H, Kiziltepe T, Ikeda H, Kawano Y, French M, Blumenthal M, Tam V, Kertesz NL, Malyankar UM, Hokenson M, Pham T, Zeng Q, Patterson JB, Richardson PG, Munshi NC and Anderson KC. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* 119, 5772-81.
- Mizushima N, Yoshimori T and Ohsumi Y. (2003). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 553-61.
- Mizushima N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2491-502.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM and Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-75.
- Mizushima N, Yoshimori T and Ohsumi Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107-32.
- Moenner M, Pluquet O, Bouche-careilh M and Chevet E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res* 67, 10631-4.
- Mourad G, Garrigue V, Bismuth J, Szwarc I and Delmas S. (2005). Suivi des complications non immunologiques de la transplantation rénale. ed Elsevier Masson.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D and Mellor AL. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22, 633-42.
- Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K and Yamanaka S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 24, 6710-8.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW and Choi AM. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12, 222-30.
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N and Otsu K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13, 619-24.
- Nakamura M, Yamabe H, Osawa H, Nakamura N, Shimada M, Kumasaka R, Murakami R, Fujita T, Osanai T and Okumura K. (2006). Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant* 21, 1489-95.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD and Chapman JR. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349, 2326-33.
- Nankivell BJ and Chapman JR. (2006). Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 81, 643-54.

- Nezis IP and Stenmark H. (2012). p62 at the Interface of Autophagy, Oxidative Stress Signaling, and Cancer. *Antioxid Redox Signal*.
- Nguan CY and Du C. (2009). Renal tubular epithelial cells as immunoregulatory cells in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 23, 129-38.
- Ni M and Lee AS. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 581, 3641-51.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A and Ichijo H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16, 1345-55.
- Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M and Yuzaki M. (2007). Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* 3, 591-6.
- Norman JT and Fine LG. (2006). Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 989-96.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F and Imaizumi K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26, 9220-31.
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K and Hayashi H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 24, 1243-55.
- Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I, Ingelfinger JR, Ogawa S, Fujita T and Nangaku M. (2006). Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 70, 1447-55.
- Ostendorf T, Eitner F and Floege J. (2012). The PDGF family in renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 27, 1041-50.
- Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E and Mori M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109, 525-32.
- Oyadomari S and Mori M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11, 381-9.
- Pallet N, Bouvier N, Bendjallab A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, Legendre C, Beaune P, Thervet E and Anglicheau D. (2008a). Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 8, 2283-96.
- Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, Thervet E and Anglicheau D. (2008b). Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 4, 783-91.
- Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, Imbeaud S, Agier N, Hertig A, Thervet E, Legendre C, Beaune P and Anglicheau D. (2008c). Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 229, 184-96.
- Pallet N, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Thervet E and Anglicheau D. (2009). [Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]. *Nephrol Ther* 5, 173-80.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G and Johansen T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate

- degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131-45.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD and Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-39.
- Pei Y, Chen ZP, Ju HQ, Komatsu M, Ji YH, Liu G, Guo CW, Zhang YJ, Yang CR, Wang YF and Kitazato K. (2011). Autophagy is involved in anti-viral activity of pentagalloylglucose (PGG) against Herpes simplex virus type 1 infection in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 405, 186-91.
- Pereira ER, Liao N, Neale GA and Hendershot LM. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One* 5.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH and Remuzzi G. (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364, 1814-27.
- Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Wei Q, Smith R, Yin XM and Dong Z. (2008). Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 74, 631-40.
- Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P and Dong Z. (2009). Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F244-56.
- Peters LR and Raghavan M. (2011). Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *J Immunol* 187, 919-31.
- Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N and He YW. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* 204, 25-31.
- Pua HH, Guo J, Komatsu M and He YW. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* 182, 4046-55.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P and Strasser A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-49.
- Qi W, Chen X, Poronnik P and Pollock CA. (2008). Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 9-13.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G and Levine B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112, 1809-20.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C and Levine B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931-46.
- Raben N, Hill V, Shea L, Takikita S, Baum R, Mizushima N, Ralston E and Plotz P. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet* 17, 3897-908.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ and Rubinsztein DC. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-95.

- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR and Rubinsztein DC. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90, 1383-435.
- Reinders ME, Rabelink TJ and Briscoe DM. (2006). Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 17, 932-42.
- Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, Mori K, Glimcher LH, Denko NC, Giaccia AJ, Le QT and Koong AC. (2004). XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res* 64, 5943-7.
- Ron D and Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-29.
- Rosin DL and Okusa MD. (2011). Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22, 416-25.
- Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M and Wouters BG. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120, 127-41.
- Rudnicki M, Perco P, Enrich J, Eder S, Heininger D, Bernthaler A, Wiesinger M, Sarkozi R, Noppert SJ, Schramek H, Mayer B, Oberbauer R and Mayer G. (2009). Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab Invest* 89, 337-46.
- Rusten TE and Stenmark H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci* 122, 2179-83.
- Saitoh T and Akira S. (2010). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol* 189, 925-35.
- Samuel VT and Shulman GI. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-71.
- Scheuner D and Kaufman RJ. (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 29, 317-33.
- Schoenborn JR and Wilson CB. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96, 41-101.
- Schrier RW, Wang W, Poole B and Mitra A. (2004). Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114, 5-14.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T and Hume DA. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-89.
- Schroder K and Tschopp J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-32.
- Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Sis B, Hidalgo LG, Matas AJ, Kaplan B and Halloran PF. (2011). Inflammation lesions in kidney transplant biopsies: association with survival is due to the underlying diseases. *Am J Transplant* 11, 489-99.
- Sengupta S, Peterson TR and Sabatini DM. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40, 310-22.
- Sharma B, Altman JK, Goussetis DJ, Verma AK and Platanias LC. (2011). Protein kinase R as mediator of the effects of interferon (IFN) gamma and tumor necrosis factor (TNF) alpha on normal and dysplastic hematopoiesis. *J Biol Chem* 286, 27506-14.
- Shaw RJ. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 196, 65-80.

- Shen HM and Codogno P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457-65.
- Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Metivier D, Maiuri MC, Kroemer RT and Kroemer G. (2011). Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* 30, 4544-56.
- Sheridan AM and Bonventre JV. (2000). Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9, 427-34.
- Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A and Kehrl JH. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 13, 255-63.
- Shigeoka AA, Mueller JL, Kambo A, Mathison JC, King AJ, Hall WF, Correia Jda S, Ulevitch RJ, Hoffman HM and McKay DB. (2010). An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 185, 6277-85.
- Shimizu A and Yamanaka N. (1993). Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64, 171-80.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB and Tsujimoto Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-8.
- Siedlecki A, Irish W and Brennan DC. (2011). Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 11, 2279-96.
- Singh SB, Davis AS, Taylor GA and Deretic V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-41.
- Sinha S and Levine B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S137-48.
- Sis B, Famulski KS, Allanach KL, Zhu LF and Halloran PF. (2007). IFN- γ prevents early perforin-granzyme-mediated destruction of kidney allografts by inducing donor class I products in the kidney. *Am J Transplant* 7, 2301-10.
- Song H, Park H, Kim YS, Kim KD, Lee HK, Cho DH, Yang JW and Hur DY. (2011). L-kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol* 11, 932-8.
- Spriggs KA, Bushell M and Willis AE. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 40, 228-37.
- Stephenson LM, Miller BC, Ng A, Eisenberg J, Zhao Z, Cadwell K, Graham DB, Mizushima NN, Xavier R, Virgin HW and Swat W. (2009). Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy* 5, 625-35.
- Stroupe C. (2011). Autophagy: cells SNARE selves. *Curr Biol* 21, R697-9.
- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA and Neilson EG. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61, 1714-28.
- Sumpter R, Jr. and Levine B. (2010). Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol* 21, 699-711.
- Szwarc I, Garrigue V, Delmas S, Deleuze S, Chong G and Mourad G. (2005). [Delayed graft function: a frequent but still unsolved problem in renal transplantation]. *Nephrol Ther* 1, 325-34.
- Tabas I and Ron D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184-90.

- Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y and Rakugi H. (2012). Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol* 180, 517-25.
- Talloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL and Levine B. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 190-5.
- Talloczy Z, Virgin HWt and Levine B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2, 24-9.
- Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S and Tohyama M. (2001). ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 7, 317-23.
- Tanaka T, Hanafusa N, Ingelfinger JR, Ohse T, Fujita T and Nangaku M. (2003). Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 222-31.
- Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H and Koya D. (2012). Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012, 628978.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T and Kominami E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* 276, 1701-6.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T and Kominami E. (2002). Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 277, 13739-44.
- Tello-Montoliu A, Patel JV and Lip GY. (2006). Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost* 4, 1864-74.
- Thiery JP and Sleeman JP. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-42.
- Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N and Randow F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 10, 1215-21.
- Tilney NL and Guttman RD. (1997). Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 64, 945-7.
- Tooze SA and Yoshimori T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12, 831-5.
- Tsai YC and Weissman AM. (2010). The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* 1, 764-778.
- Tsukada M and Ohsumi Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169-74.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP and Ron D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-6.
- van Roeyen CR, Ostendorf T and Floege J. (2012). The platelet-derived growth factor system in renal disease: an emerging role of endogenous inhibitors. *Eur J Cell Biol* 91, 542-51.

- Walter P and Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-6.
- Wang YC, Lin S and Yang QW. (2011). Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflammation* 8, 134.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M and Levine B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30, 678-88.
- Weide T and Huber TB. (2011). Implications of autophagy for glomerular aging and disease. *Cell Tissue Res* 343, 467-73.
- White E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*.
- Wiedlocha A. (1999). Following angiogenin during angiogenesis: a journey from the cell surface to the nucleolus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47, 299-305.
- Wiegele G, Brandis M and Zimmerhackl LB. (1998). Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). *Nephrol Dial Transplant* 13, 1158-67.
- Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, Dotsch V, Bumann D and Dikic I. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228-33.
- Wilkinson KD. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11, 141-8.
- Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF and Chadban SJ. (2007). TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 117, 2847-59.
- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P and Shen HM. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 285, 10850-61.
- Xie Z and Klionsky DJ. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102-9.
- Xu C, Bailly-Maitre B and Reed JC. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656-64.
- Yamaguchi H and Wang HG. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279, 45495-502.
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R and Tashiro Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23, 33-42.
- Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF and Anderson P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol* 185, 35-42.
- Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, Huang T, Nakajima S, Yao J, Paton AW, Paton JC and Kitamura M. (2009). Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol* 183, 1480-7.
- Yang J and Liu Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465-75.

- Yoneyama M and Fujita T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282, 15315-8.
- Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee SJ, Choi JA and Koh JY. (2010). Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 6030-7.
- Yorimitsu T, Nair U, Yang Z and Klionsky DJ. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 281, 30299-304.
- Yoshida H. (2007a). Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal* 9, 2323-33.
- Yoshida H. (2007b). ER stress and diseases. *FEBS J* 274, 630-58.
- Yu L, Border WA, Huang Y and Noble NA. (2003). TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 64, 844-56.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ and Heintz N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15077-82.
- Zalcvar E, Berissi H, Mizrachi L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R and Kimchi A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10, 285-92.
- Zeisberg M and Kalluri R. (2004). The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 82, 175-81.
- Zhang K and Kaufman RJ. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 25935-8.
- Zhang K and Kaufman RJ. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-62.
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N and Yue Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11, 468-76.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P and Tschopp J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221-5.
- Zhu S, Wang Y, Jin J, Guan C, Li M, Xi C, Ouyang Z, Chen M, Qiu Y, Huang M and Huang Z. (2012). Endoplasmic reticulum stress mediates aristolochic acid I-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 26, 663-71.

RÉSUMÉ

Dans le cadre de situations pathologiques, le rein peut être soumis à de multiples agressions toxiques, ischémiques et immunologiques pouvant favoriser la survenue d'une maladie rénale chronique et le développement d'une insuffisance rénale. En réponse à ces stress, les cellules du parenchyme rénal vont activer des processus biologiques adaptatifs permettant le maintien de la viabilité cellulaire et l'homéostasie de l'organe. Ces réponses adaptatives peuvent également activer l'immunité innée et induire le remodelage tissulaire (fibrogenèse et angiogenèse). Cependant, les mécanismes précis de cette régulation sont mal connus. L'objectif de ce travail a été de caractériser les mécanismes de régulation et les conséquences microenvironnementales (inflammation et angiogenèse) de l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et de l'autophagie, en réponse à des stress ischémiques et immunologiques. Dans un premier travail, nous avons montré que la réponse UPR est impliquée dans la génération d'une réponse inflammatoire induite par un stress métabolique dans des cellules tubulaires rénales. Le stress métabolique, caractérisé par une carence en glucose, induit un stress du RE et active la réponse UPR. Ce stress active le facteur NF- κ B et favorise la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. La voie PERK/eIF2 α n'est pas nécessaire à l'activation de l'inflammation mais amplifie l'expression des cytokines alors que la voie IRE1 α est impliquée dans la génération de cette réponse inflammatoire. De plus, l'ischémie aiguë active le stress du RE et l'inflammation dans les reins de rat. Enfin, à partir de biopsies de déclampage de greffons rénaux, l'expression de GRP78, marqueur du stress du RE, et de NF- κ B p65/RelA dans les tubules rénaux, est significativement plus élevée en comparaison avec des biopsies de greffons rénaux stables, à distance de la greffe. Dans un second travail, nous avons montré que la réponse UPR régule l'angiogenèse dans les cellules tubulaires rénales lors d'une carence en glucose. La voie PERK est un régulateur majeur de l'expression des facteurs angiogéniques (VEGFA, bFGF et angiogénine). De plus, l'expression de l'angiogénine est modulée par les voies PERK et IRE1 α . Enfin, l'ischémie aiguë induite chez le rat, active la réponse UPR parallèlement à l'augmentation de l'expression de VEGFA, bFGF et de l'angiogénine. Dans un troisième travail, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel l'interféron γ (IFN γ) active l'autophagie dans les cellules tubulaires rénales. Nous avons montré que l'IFN γ entraîne une déplétion en tryptophane, active la voie GCN2, une kinase eIF2 α , ce qui conduit à l'augmentation du flux autophagique. De plus, la supplémentation en tryptophane et l'utilisation d'ARN interférence dirigés contre GCN2 inhibent l'autophagie induite par l'IFN γ . Enfin, l'autophagie intervient dans la régulation de la sécrétion de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance en réponse à l'IFN γ . En conclusion, nous avons caractérisé dans ce travail des mécanismes originaux de régulation d'une réponse inflammatoire et angiogénique par la réponse UPR et l'autophagie en réponse à des stress ischémiques et immunologiques au sein de l'épithélium tubulaire rénal humain.

ABSTRACT

Under pathological conditions, kidney is subjected to multiple toxic, ischemic and immunological failures that promote the occurrence of chronic kidney disease and the development of acute kidney injury. In response to stress, renal parenchymal cells activate biological adaptive processes permitting the maintenance of cell viability and renal homeostasis. These adaptive responses can also activate innate immunity and induce tissue remodeling (fibrogenesis and angiogenesis). However, accurate mechanisms of this regulation are still unclear. The aim of this work was to characterize regulation mechanisms and micro environmental consequences (inflammation and angiogenesis) of the activation of the UPR (Unfolded Protein Response) and autophagy, in response to ischemic and immunological stress. In a first study, we demonstrated that the UPR is involved in the generation of inflammatory response induces by metabolic stress in tubular renal cells. Metabolic stress, characterized by glucose deprivation, induces an ER stress and activates the UPR. This stress activates NF- κ B and promotes the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines. The PERK signaling is not required for the induction of inflammation but amplifies cytokine expression whereas IRE1 is involved in the generation of inflammatory response. Moreover, acute ischemia activates ER stress and inflammation in rat kidneys. Finally, from kidney transplant biopsies performed before implantation, the expression of GRP78, an ER stress marker, and NF- κ B p65/RelA in renal tubules is significantly increased in comparison with stable human kidney transplant biopsies. In a second study, we showed that the UPR regulates angiogenesis in tubular renal cells during glucose deprivation. The PERK pathway is a major regulator of angiogenic factors expression (VEGFA, bFGF and angiogenin). Furthermore, angiogenin expression is modulated by PERK and IRE1 α pathways. Finally, acute ischemia activates the UPR and, in parallel, increases VEGFA, bFGF and angiogenin expression in rat kidneys. In a third work, we identified a novel mechanism by which IFN γ activates autophagy in human kidney epithelial cells. We showed that IFN γ promotes tryptophan depletion, activates the eIF2 α kinase GCN2, and leads to an increase of the autophagic flux. Moreover, tryptophan supplementation and RNA interference directed against GCN2 inhibit IFN γ -induced autophagy. Finally, autophagy regulates the secretion of inflammatory cytokines and growth factors in response to IFN γ . In conclusion, we characterized in this work original mechanisms that regulate inflammatory and angiogenic responses by the UPR and autophagy in response to ischemic and immunological stress in tubular renal human epithelium.